

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular

**CARACTERIZACIÓN DE LA MODIFICACIÓN POR *O*-GlcNAc
DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDE DEL POTYVIRUS *Plum pox virus*
Y SU RELEVANCIA PARA LA INFECCIÓN VIRAL**

TESIS DOCTORAL

Autor:

José de Jesús Pérez Martínez

Director:

Dr. Juan Antonio García Álvarez

Departamento de Genética Molecular de Plantas

Centro Nacional de Biotecnología

Madrid, España. 2013.

Agradecimientos:

A todos y cada uno que hicieron posible la realización de esta tesis... Gracias.

ABSTRACT

The addition of residues of N-acetylglucosamine through *O* linkages (*O*-GlcNAc) to target proteins is a post-translational modification widely distributed in eukaryotic cells. A large number of *O*-GlcNAc modification sites have been mapped in mammalian proteins and the functions of these proteins have been thoroughly studied. However in plants, targets of *O*-GlcNAcylation are largely uncharacterized. *Arabidopsis thaliana* has two *O*-GlcNAc transferases (OGTs), Spindly (SPY) and Secret Agent (SEC), and previous results of the laboratory where this PhD thesis was carried out demonstrated that the coat protein (CP) of the potyvirus *Plum pox virus* (PPV) is *O*-GlcNAcylated and phosphorylated. In this work, we identified that SEC, and not SPY, is the OGT responsible of the PPV CP *O*-GlcNAcylation. In null *sec*⁻ mutants of *A. thaliana* and in *Nicotiana benthamiana* transgenic plants in which the SEC-like genes were silenced by RNAi, *O*-GlcNAcylation of PPV CP was abolished or drastically disturbed, respectively. Virus accumulation was reduced at early times of infection in these plants compared to wild type plants.

Site-directed mutagenesis and mass spectrometry analysis demonstrated that threonines 19, 24, 41, 50, 53, 54 and 58 could be modified by *O*-GlcNAc or influenced the modification of other residues. Further mapping by ETD MS/MS confirmed that Thr-19, Thr-24, Thr-41, Thr-53 and Thr-54 and/or Thr-58, as well as the serine 65 are *O*-GlcNAcylation targets. CP *O*-GlcNAcylation appeared to be completely abolished in a PPV multiple mutant (PPV CP7-T/A) in which the seven threonines involved in *O*-GlcNAc modification were replaced by alanines. The *O*-GlcNAcylation-deficient PPV mutant infected *N. clevelandii*, *N. benthamiana*, and *P. persica* without noticeable defects. In contrast, this mutant infected poorly *A. thaliana*. The host-specific relevance of *O*-GlcNAcylation of PPV CP is further supported by the result of mixed infections in different host plants. *O*-GlcNAcylation seems to enhance PPV CP stability in a host-specific way. Thus, CP of PPV CP7T/A was much more unstable than that of wild type PPV in extracts of *A. thaliana*, whereas differences in stability of the two CPs was less noticeable in extracts of *N. clevelandii* and *P. persica*. The stabilities of wild type and CP7T/A CPs were quite similar in extracts of *A. thaliana sec*⁻, suggesting that the instability of the CP7T/A CP is the result of the *O*-GlcNAcylation deficiency rather than of the amino acid substitutions. All these results are in agreement with a fine-tuning effect of CP *O*-GlcNAcylation on PPV infection, probably facilitating its adaptation to different hosts and environmental conditions.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
Abreviaturas y anglicismos	ix
Virus citados	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Modificaciones postraduccionales	3
I.2. Glicosilación de proteínas	5
I.2.1 Gliptación	6
I.2.2 Fosfoglicosilación	7
I.2.3 C-manosilación	7
I.2.4 N-glicosilación	7
I.2.5 O-glicosilación	8
I.3. Modificación de proteínas mediante O-GlcNAcilación	10
I.4. Estructura y regulación de las enzimas del ciclo de la O-GlcNAcilación	12
I.5. Interrelación entre la O-GlcNAcilación y la fosforilación de proteínas	14
I.6. Funciones de la modificación de proteínas por O-GlcNAcilación	16
I.7. La O-GlcNAcilación de proteínas en plantas	17
I.8. Estructura de las OGTs de plantas y funciones en las que participan	18
I.9. Modificación por O-GlcNAcilación de proteínas virales	20
I.10. La sharka, una enfermedad de árboles del género <i>Prunus</i>	20
I.11. Genoma y expresión génica del PPV	21
II. OBJETIVOS	25

III. MATERIALES Y MÉTODOS	29
III.1. MATERIAL BIOLÓGICO	31
III.1.1. Plantas	31
III.1.2. Bacterias y plásmidos	31
III.1.2.1. Bacterias	31
III.1.2.2. Clones de cDNA del genoma completo del PPV	32
III.2. MANIPULACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO	32
III.2.1. Inoculación del PPV	33
III.2.1.1. Inoculación biolística	33
III.2.1.2. Inoculación manual	33
III.2.1.3. Inoculación mediante agroinfiltración	33
III.2.2. Purificación de viriones del PPV	34
III.2.3. Manipulación de plantas en cultivos <i>in vitro</i>	34
III.2.3.1. Transformación y desarrollo de plantas a partir de discos de hoja	34
III.2.3.2. Análisis de segregación de líneas tras reproducción sexual	35
III.2.4. Monitorización de la infección viral	35
III.3. PREPARACIÓN Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	35
III.3.1. Purificación de ácidos nucleicos	35
III.3.1.1. Obtención de DNA plasmídico	35
III.3.1.2. Obtención de DNA genómico de plantas	36
III.3.1.3. Obtención de RNA total de plantas	36
III.3.2. Tratamientos enzimáticos en los procesos de clonación	36
III.3.3. Amplificación de DNA mediante PCR	36
III.3.4. Amplificación de RNA viral mediante inmunocaptura y RT-PCR (IC-RT-PCR)	37
III.3.5. Electroforesis en geles de agarosa. Extracción y purificación de los fragmentos de DNA separados por electroforesis	37
III.3.6. Secuenciación de DNA	37
III.3.7. Marcaje de RNA para la realización de sondas radioactivas	38
III.3.8. Detección de secuencias de RNA por hibridación con sondas radioactivas	38

III.4. OLIGONUCLEÓTIDOS	38
III.4.1. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de los mutantes de cada ecotipo de <i>Arabidopsis</i>	38
III.4.2. Oligonucleótidos utilizados para la obtención de los diferentes mutantes puntuales y múltiples de la CP del PPV	39
III.4.3. Oligonucleótidos utilizados en la construcción y análisis de los plásmidos con las IR de <i>SEC</i>	40
III.5. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS	40
III.5.1. Obtención de plásmidos con mutaciones puntuales en la secuencia codificante de la CP del PPV	40
III.5.2. Construcción de plásmidos con repeticiones invertidas (IR) de fragmentos de los genes <i>SEC-b2</i> y <i>SEC-b3</i>	42
III.5.3. Construcción de un plásmido para ser utilizado en la obtención de una sonda radiactiva para detectar el nivel de expresión de SEC	43
III.6. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS	43
III.6.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida y análisis de western	43
III.7. ANALISIS DE LA CP DEL PPV POR ESPECTROSCOPIA DE MASAS	44
II.7.1. Análisis por MALDI-TOF de la CP del PPV	44
II.7.2. Análisis por LC-MS/MS de la CP del PPV	44
 IV. RESULTADOS	 47
IV.1. IDENTIFICACIÓN DE SECRET AGENT (SEC) COMO LA <i>O</i>-GlcNAc TRANSFERASA (OGT) QUE GLICOSILA A LA CP DEL PPV	49
IV.1.1. La región N-terminal de la CP del PPV está <i>O</i> -GlcNAcilada tanto en plantas de <i>A. thaliana</i> como en plantas de <i>N. benthamiana</i>	49
IV.1.2. La infección del PPV se ve alterada en <i>A. thaliana</i> por mutaciones <i>sec</i>	50
IV.1.3. La <i>O</i> -GlcNAcilación de la región N-terminal de la CP del PPV se pierde por mutaciones <i>sec</i> ⁻ , pero no se ve afectada por una mutación <i>spy</i> ⁻	53

IV.2. IDENTIFICACIÓN DE DOS SITIOS MODIFICADOS CON <i>O</i>-GlcNAc EN LA REGIÓN N-TERMINAL DE LA CP DEL PPV	55
IV.2.1. Mutantes del PPV con sustituciones T19A, T24A y S25A en su CP son viables en plantas de <i>N. clevelandii</i>	55
IV.2.2. Thr-19 y Thr-24 de la CP del PPV están modificadas por un único residuo <i>O</i> -GlcNAc	57
IV.2.3. La <i>O</i> -GlcNAcilación de la CP en Thr-19 y Thr-24 no es necesaria para la infección del PPV en <i>Prunus</i>	59
IV.3. LOCALIZACIÓN DE SITIOS DE <i>O</i>-GlcNAcilACIÓN EN LA CP DEL PPV FUERA DEL PÉPTIDO 1-39	60
IV.3.1. Localización de sitios de <i>O</i> -GlcNAcilación en la CP del PPV en la región 40-43	60
IV.3.2. Localización de sitios de <i>O</i> -GlcNAcilación en la CP del PPV en la región 44-93	64
IV.4. EFECTO DE LA <i>O</i>-GlcNAcilACIÓN DE LA CP SOBRE LA INFECCIÓN DEL PPV	68
IV.4.1. La <i>O</i> -GlcNAcilación de la CP afecta de manera diferente a la infección del PPV en diferentes huéspedes	68
IV.4.2. La pérdida de la <i>O</i> -GlcNAcilación incrementa la sensibilidad a proteasas de la CP del PPV	73
IV.5. EFECTOS DEL SILENCIAMIENTO DE SEC SOBRE LA INFECCIÓN DEL PPV EN <i>Nicotiana benthamiana</i>	75
IV.5.1. Obtención de plantas transgénicas de <i>N. benthamiana</i> silenciadas constitutivamente en los genes <i>SEC-b2</i> y <i>SEC-b3</i>	77
IV.5.2. Efecto sobre la acumulación viral del PPV del silenciamiento de SEC en plantas de <i>N. benthamiana</i> que expresan IRs de <i>SEC-b2</i> y <i>SEC-b3</i>	78
IV.5.3. Efecto sobre la <i>O</i> -GlcNAcilación de la CP del PPV del silenciamiento de SEC en plantas de <i>N. benthamiana</i> que expresan IRs de <i>SEC-b2</i> y <i>SEC-b3</i>	81
V. DISCUSIÓN	85

V.1. IDENTIFICACIÓN DE LA(S) ENZIMA(S) OGT(S) IMPLICADA(S) EN LA O-GlcNAcILACIÓN DE LA CP DEL PPV	87
V.2. IDENTIFICACIÓN DE DIANAS DE O-GlcNAcILACIÓN EN LA CP DEL PPV	89
V.3. PAPEL DE LA O-GlcNAcILACIÓN DE LA CP EN LA INFECCIÓN DEL PPV	91
 VI. CONCLUSIONES	 95
 VII. BIBLIOGRAFÍA	 99

Abreviaturas y anglicismos

aa:	Aminoácido
Ac:	Acetilación
a.i.:	Intensidad arbitraria
ATPasa:	Adenosin tri-fosfatasa
BAP:	Bencil amino Purina
bp:	Pares de bases
BrEt:	Bromuro de etidio
cDNA:	Ácido desoxirribonucleico complementario
CI:	Inclusiones cilíndricas
Col-0:	Columbia-0
CP:	Proteína de la cápside
Da:	Daltons
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DNAsa:	Desoxirribonucleasa
DO:	Densidad óptica
dsRNA	RNA de doble cadena
ATH:	Acetiltransferasa de histonas
dpi:	Días después de la inoculación
EDTA:	Ácido etilén-diamino tetra-acético
GFP:	Proteína fluorescente verde
GFA:	Glucosamina-fructosa-6-fosfato aminotransferasa
GlcNAc:	β -D-N-acetilglucosamina
h:	Hora(s)
IC-RT-PCR:	Inmunocaptura seguida de retrotranscripción y PCR
IgG:	Inmunoglobulina G
i.d.:	Diámetro interno
IR:	Repeticiones invertidas
kb:	Kilobase(s)
kDa:	Kilodalton(s)
kV:	Kilovoltio(s)
Ler:	Landsberg erecta

MES:	Ácido 4-morfolinetanosulfónico
min:	Minutos
MOPS:	Ácido 4-morfolinpropanosulfónico
mRNA:	Ácido ribonucleico mensajero
m/z:	Relación masa/carga
NAA:	Ácido 1-naftaleno acético
NCAPs:	Non-cell autonomous proteins
NI:	Inclusión nuclear
NOS:	Nopalina sintetasa
nt:	Nucleótido(s)
NTPasa:	Nucleósido tri-fosfatasa
o.d.:	Diámetro externo
OGA u <i>O</i> -GlcNAcase:	β - <i>N</i> -acetilglucosaminidasa
<i>O</i> -GlcNAcilación:	Modificación por la adición de residuos de <i>O</i> -GlcNAc
OGT:	<i>O</i> -GlcNAc transferasa
OGTm:	<i>O</i> -GlcNAc transferasa mitocondrial
OGTnc:	<i>O</i> -GlcNAc transferasa núcleo citoplasmática
OGTs:	<i>O</i> -GlcNAc transferasa corta
ORF:	Marco de lectura abierto
pb:	Pares de bases
NAT	No transmisible por pulgones
NCAP:	Non-cell autonomous proteins (proteínas sin autonomía celular)
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PEST:	Dominios proteicos ricos en prolinas, glutaminas, serinas y treoninas
PIPO:	Pretty Interesting Potyviridae ORF
RNA:	Ácido ribonucleico
RNAi:	Interferencia por RNA
rRNA:	Ácido ribonucleico ribosomal
SDS:	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE:	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
SEC:	SECRET AGENT
Splicing:	Corte y empalme de RNA
SPY:	SPINDLY
SSC:	Tampón Cloruro sódico 150 mM-citrato sódico 15 mM

TBE:	Tampón Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM pH 8
TPR:	Repetición de tetratricopéptidos
UV:	Irradiación ultravioleta.
V:	Voltios
WS:	Wassilewskija
wt:	Genotipo silvestre

Virus citados

CaMV:	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
PPV:	<i>Plum pox virus</i> , virus de la sharka
PVA:	<i>Potato virus A</i>
PVY:	<i>Potato virus Y</i>
SV40:	<i>Simian virus 40</i>

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Modificaciones postraduccionales

El proteoma, o conjunto total de proteínas de la célula está formado por un número de elementos muy superior al número de proteínas directamente codificadas por el genoma, debido principalmente a dos tipos de mecanismos. Por un lado, las ediciones del mensaje genético que tienen lugar a nivel transcripcional y postranscripcional, y por otro las numerosas modificaciones postraduccionales que ocurren en uno o varios sitios en las proteínas. Estas modificaciones pueden ser irreversibles, como las derivadas de procesos proteolíticos o reversibles cuando ocurren algunas modificaciones químicas de los aminoácidos que las componen (Fig. I.1).

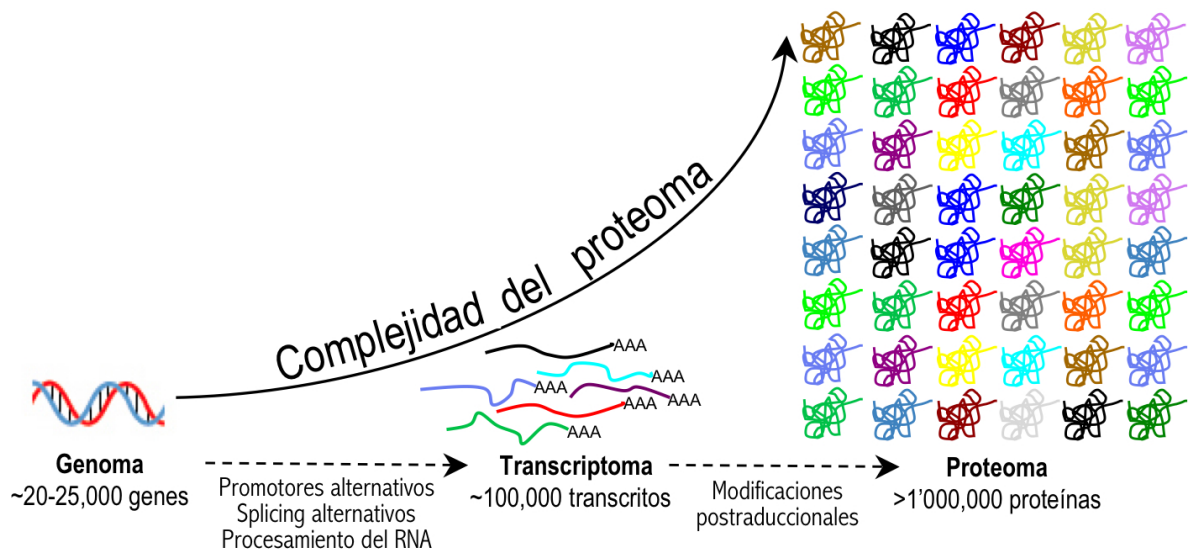


Figura I.1. Aumento de la complejidad del proteoma debido a las modificaciones postraduccionales. Las modificaciones postraduccionales de las proteínas incrementan exponencialmente la diversidad y complejidad del proteoma (<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=7CE3FCF5-0DA0-4378-A513-2E35E5E3B49B>; visitada el 3 de Septiembre de 2013).

Las modificaciones postraduccionales aumentan considerablemente la complejidad y el dinamismo de las proteínas, lo que incrementa su capacidad de coordinar y regular las distintas etapas de la vida celular. Las modificaciones postraduccionales covalentes pueden clasificarse de acuerdo a la naturaleza de las cadenas laterales del aminoácido que se modifica, la categoría de la enzima que interviene en su modificación y su grado de reversibilidad (International human genome sequencing consortium, 2004; Spiro, 1973; Walsh, 2006; Walsh y col., 2005). En la tabla I.1 se enumeran las diferentes modificaciones

de las cadenas laterales de cada uno de los aminoácidos que forman las proteínas (Walsh y col., 2005).

Tabla I.1.- Modificaciones postraduccionales en las cadenas laterales de las proteínas

Residuo	Reacción	Ejemplos
Asp	fosforilación isomerización a isoAsp	fosfatasa de tirosina; reguladores de respuesta en sistemas de dos componentes
Glu	metilación carboxilación poliglicinación poliglutamilación	proteínas receptoras de la quimiotaxis residuos Gla en coagulación sanguínea tubulina tubulina
Ser	fosforilación O-glicosilación fosfopanteteinilación autoescisión	quinasas y fosfatasa de serinas proteínas nucleares y citoplásmicas sintetasa de ácidos grasos enzima de formación de piruvamida
Thr	fosforilación O-glicosilación	quinasas de treoninas proteínas nucleares y citoplásmicas
Tyr	fosforilación sulfación orto-nitración quinona-TOPA	quinasas/fosfatasa de tirosina receptor de maduración CCR5 respuesta inflamatoria maduración de amino oxidasa
His	fosforilación aminocarboxipropilación N-metilación	sensor de quinasas en sistema regulatorio de dos componentes formación de difamina metil CoM reductasa
Lys	N-metilación N-acilación por grupos: ubiquitin acetil, biotil, lipoil y ubiquitil C-hidroxilación	metilación de histona acetilación de histona; armado de las ramas de grupos prostéticos ubiquitina, SUMO (small ubiquitin-like modifier), marcaje de proteínas maduración del colágeno
Cys	S-hidroxilación formación de enlaces disulfuro fosforilación S-acilación S-prenilación splicing de proteína	intermediario de sulfenato proteína en ambientes de oxidación PTPasas Ras Ras excisión de inteína
Met	oxidación a sulfóxido	Met sulfóxido reductasa
Arg	N-metilación N-ADP-ribosilación	histonas G _{sx}
Asn	N-glicosilación N-ADP-ribosilación splicing de proteína	N-glicoproteínas eEF-2 excisión de inteína
Gln	transglutaminación	enzimador de proteínas
Trp	C-manosilación	proteínas de la membrana plasmática
Pro	C-hidroxilación	colágeno; HIF-1 α
Gly	C-hidroxilación	formación de amida C-terminal

No se conocen modificaciones en cadenas laterales de Leu, Ile, Val, Ala y Phe.

Las cinco modificaciones postraduccionales más abundantes son: fosforilación, acetilación, glicosilación, metilación, y ubiquitinación (Walsh y col., 2005). Y de estas, probablemente la más compleja, variable, y con mayor distribución filogenética es la adición de carbohidratos a proteínas o glicosilación (Kwon y col., 2006; Spiro, 1973).

I.2. Glicosilación de proteínas

Es bien conocido que la glicosilación de proteínas afecta a su plegamiento, localización y transporte, solubilidad, antigenicidad, estabilidad y en último término a su actividad biológica en un momento y sitio determinados. Sin embargo, glicosilación es un término genérico que se utiliza para definir la unión covalente de glicanos a proteínas, pero que no refleja la enorme complejidad de las diferentes modificaciones que abarca. Los avances en el campo de la glicómica han puesto de manifiesto la relevancia y variedad de la glicosilación de proteínas en todos los organismos desde eubacterias y arqueobacterias hasta eucariotas superiores (Spiro, 2002; Varki, 1993; Varki y Lowe, 2009; Walker y col., 2009). Tradicionalmente la glicosilación se refería exclusivamente a la adición covalente de oligosacáridos complejos a proteínas de la superficie extracelular o de proteínas secretadas que se producía en el lumen del retículo endoplásmico, del aparato de Golgi y de otros organelos subcelulares (Zeidan y col., 2010). Sin embargo, en 1984 Torres y Hart (1984) describieron la presencia de azúcares en proteínas nucleares y citoplasmáticas. Desde entonces son numerosas las proteínas glicosiladas descritas que no estarían incluidas en el grupo anterior y que han cambiado radicalmente la visión acerca de la glicosilación de proteínas (Holt y Hart, 1986; O'Donnell, 2002; Torres y Hart, 1984). Una estimación comúnmente aceptada propone que más del 50% de las proteínas están glicosiladas (Apweiler y col., 1999). Sin embargo esta cifra puede estar por debajo de la real ya que no se tiene en cuenta que muchas proteínas del núcleo y del citoplasma, se modifican de una manera dinámica por la adición de residuos de β -D-N-acetilglucosamina (GlcNAc) a los grupos hidroxilos de residuos de serina o treonina (Hart y col., 2007).

La formación del enlace covalente entre el aminoácido de una proteína y una unidad de carbohidrato es el evento crucial para la biosíntesis de las glicoproteínas. Esta reacción enzimática varía dependiendo del tipo de carbohidrato y del aminoácido involucrado. Los avances de los últimos años en el campo de la glicómica han puesto de manifiesto que las combinaciones posibles entre carbohidratos y aminoácidos son muchas (Lechner y Wieland, 1989; Messner, 1997; Spiro, 2002; Varki, 1993). Actualmente se conocen 13 tipos diferentes

de monosacáridos que participan con 8 aminoácidos en este tipo de enlaces y que dan lugar a un total de 41 tipos diferentes de combinaciones. Las glicosilaciones en proteínas se pueden clasificar en cinco grupos en función del tipo de enlace glicopeptídico que las origina: *N*-, *O*-, *C*-glicosilación, fosfoglicosilación, y gliptación (Fig. 1.2). En muchos casos, en la misma proteína tiene lugar más de un tipo de enlace azúcar-aminoácido, dependiendo de la disponibilidad de la maquinaria enzimática, de la secuencia de aminoácidos y de la conformación de la proteína (Spiro, 2002).

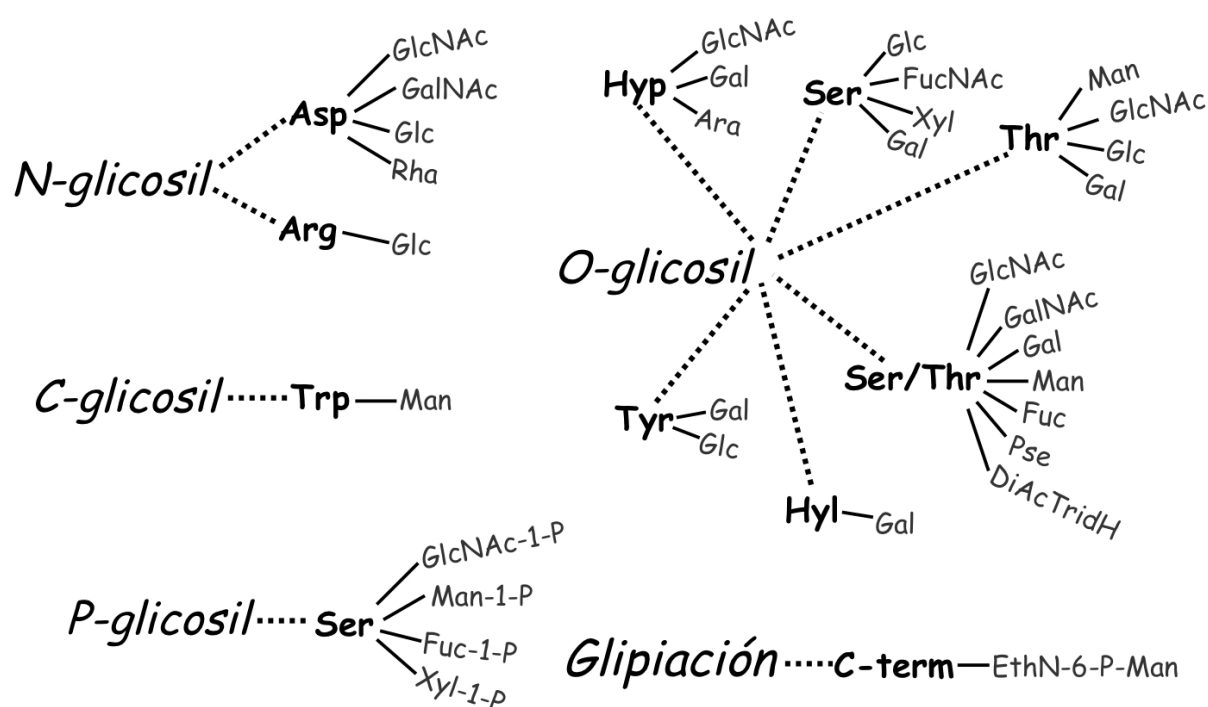


Figura I.2. Representación esquemática de los cinco tipos distintos de enlaces glicopeptídicos identificados. Las abreviaturas *DiAcTridH* y *C-term* se refieren a 2,4,-diacetamido, 2,4,6-trideoxihexosa, y al residuo carboxi-terminal de las proteínas respectivamente (Spiro, 2002).

A continuación se resume la información acerca de los 5 grupos de modificaciones por carbohidratos que, hasta el momento, se han identificado, prestando una atención especial a la *O*-GlcNAcilación de Ser/Thr que ha sido la modificación por glicanos objeto de estudio en esta tesis.

I.2.1 Gliptación

En la gliptación la unión del carbohidrato a la proteína se realiza mediante el glicofosfatidilinositol. En este enlace la manosa se une al grupo carboxilo terminal de la

proteína por un enlace fosfoetanolamina. Este tipo de modificación se encuentra ampliamente distribuida en proteínas de la superficie celular de eucariotas, incluyendo las glicoproteínas de superficie de tripanosomas y el antígeno Thy-1 (Ferguson, 1999). También se han detectado modificaciones de este tipo en proteínas de arqueobacterias (Kobayashi y col., 1997).

I.2.2 Fosfoglicosilación

En este tipo de glicoproteínas el azúcar se une a la proteína mediante un enlace de tipo fosfodiéster entre los residuos de GlcNAc, manosa, xilosa o fucosa y las serinas de las proteínas (Haynes, 1998). Las uniones de tipo GlcNAc- α -1-P-Ser se han descrito en varias proteínas de *Dictyostelium*, incluyendo la proteinasa-1 (Mehta y col., 1996). Los enlaces de tipo manosa- α -1-P-Ser se han observado en varias proteínas de *Leishmania* (Guha-Niyogi y col., 2001). Finalmente, las uniones de tipo xilosa-1-P-Ser se han encontrado en varias proteínas de *Tripanosoma* (Haynes, 1998). En *Dictyostelium* también se han descrito modificaciones de tipo fucosa- β -1-P-Ser (Srikrishna y col., 1998).

I.2.3 C-manosilación

La C-manosilación es una modificación postraduccional de tipo α por un enlace C-C, entre el C-2 del triptófano y la manosa (de Beer y col., 1995). Este tipo de unión, a diferencia de las N- o las O-glicosilaciones, que se explican más adelante, no implica a los grupos funcionales de los aminoácidos. Estas modificaciones se han encontrado en proteínas de mamíferos como la RNAsa2 (de Beer y col., 1995), la interleucina-12 (Doucey y col., 1999), y la properdina (Hartmann y Hofsteenge, 2000).

I.2.4 N-glicosilación

La adición de residuos de GlcNAc a las asparaginas de las proteínas por un enlace de tipo β -glicosilamina, representa la modificación por carbohidratos más ampliamente distribuida en la naturaleza y es más compleja en estructura y arquitectura que la O-glicosilación en eucariotas (Mechref y Novotny, 2002). Este enlace es el sitio de anclaje de una gran variedad de oligosacáridos complejos con múltiples residuos de manosa (Montreuil, 1980; Spiro, 1973). El enlace de tipo β entre el residuo GlcNAc y la asparagina se describió por primera vez en ovoalbúmina (Johansen y col., 1961). Posteriormente, este tipo de

modificación se ha observado también en una gran variedad de proteínas de células eucariotas, como proteínas plasmáticas, tiroglobulinas, hormonas, enzimas, receptores celulares de superficie, inmunoglobulinas y lectinas (Montreuil, 1980; Spiro, 1973). Frecuentemente estos enlaces de tipo *N* se encuentran junto a modificaciones de tipo *O* en muchas proteínas (Spiro, 2002), incluso en moléculas que son generalmente modificadas por *O*-glicosilaciones como las mucinas (Perez-Vilar y col., 1996), los proteoglicanos (Lohmander y col., 1980; Parthasarathy y Spiro, 1984) y el colágeno (Nayak y Spiro, 1991). Aunque la modificación por GlcNAc de las asparaginas de una proteína por un enlace de tipo β predomina en células eucariotas, también se ha observado en proteínas de arqueobacterias y eubacterias (Erickson y Herzberg, 1993; Yang y Haug, 1979). Se calcula que un tercio de las proteínas que entran en la vía secretora en eucariotas pueden estar *N*-glicosiladas y por tanto decenas de miles de variantes de glicoproteínas pueden coexistir en las células eucariotas (Walsh y col., 2005). Este es el único tipo de glicosilación cuyas dianas muestran secuencias de reconocimiento bien definidas, con un consenso del tipo Asn-X-Ser/Thr. Aunque esta secuencia es muy frecuente en las proteínas, no está necesariamente acompañada de la presencia de un enlace *N*-glicosídico, probablemente debido a factores conformacionales (Apweiler y col., 1999).

I.2.5 *O*-glicosilación

Las uniones *O*-glicopeptídicas en proteínas eucariotas son generalmente más cortas y menos complejas que las de las *N*-glicoproteínas. Todos los aminoácidos con grupos hidroxilos pueden establecer este tipo de enlace: serina, treonina, tirosina, hidroxiprolina e hidroxilisina (Spiro, 2002). Los tipos de enlace *O*-glicosídicos son muy variados dependiendo del azúcar y de la configuración anomérica del enlace (Tabla I.2) (Spiro, 2002). De todos estos enlaces de tipo *O*, los que se dan entre residuos sencillos de GlcNAc y los grupos hidroxilos de serinas o treoninas de las proteínas (*O*-GlcNAcilación) alcanzan cada vez más importancia. La *O*-GlcNAcilación, está ampliamente distribuida entre organismos eucariotas tanto en proteínas nucleares como citoplasmáticas. De hecho representa el primer ejemplo de proteínas glicosiladas que se encuentra fuera de las rutas secretoras (Hart, 1997). A este tipo de enlace se le presta una especial atención en los siguientes apartados por ser la modificación postraducciona que se ha analizado en esta tesis.

Tabla I.2.- Naturaleza y distribución de los enlaces azúcar-aminoácido en las glicoproteínas (Spiro, 2002)

Tipo de enlace	Eslabonamiento			Distribución filogenética			Ejemplos
	Aminoácido	Azúcar	Configuración	Eucar.	Arch.	Bacter.	
N-glicosil	Asp	GlcNAc	β	+	+	+	Ovoalbúmina, fetuina, receptor de insulina
	Asp	Glc	β	+	+	-	Laminina, capa-S de <i>Halobacter halobium</i>
	Asp	GalNAc	*	-	+	-	Capa-S de <i>H. halobium</i>
	Asp	Rha	*	-	-	+	Pared celular de <i>Streptococcus sanguis</i>
	Arg	Glc	β	+	-	-	Amilogenina de maíz dulce
O-Glicosil	Ser/Thr	GalNAc	α	+	-	-	Mucinas, fetuina, glicoporina
	Ser/Thr	GalNAc	β	-	+	-	Capa-S de <i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>
	Ser/Thr	GlcNAc	β	+	-	-	Proteínas nucleares y citoplasmáticas
	Ser/Thr	Gal	α	+	-	+	Colágeno de lombriz de tierra, <i>Bacteroides cellulosolvens</i>
	Ser/Thr	Man	α	+	-	-	Manoproteínas de levadura
	Ser/Thr	Man	*	+	-	+	α -distroglicano de <i>Flavobacterium meningosepticum</i>
	Ser/Thr	Fuc	α	+	-	-	Factores de coagulación y fibrinolíticos
	Ser/Thr	Pse	α	-	-	+	Flagelinas de <i>Campylobacter jejuni</i>
	Ser/Thr	DiActrideoxihexosa *		-	-	+	Pili de <i>N. meningitidis</i>
	Ser	Glc	β	+	-	-	Factores de coagulación
	Ser	FucNAc	β	-	-	+	Pili de <i>P. aeruginosa</i>
	Ser	Xyl	β	+	-	-	Proteoglicanos
	Ser	Gal	α	+	-	-	Pared celular de plantas
	Thr	Man	α	-	-	+	Proteínas secretadas de <i>M. tuberculosis</i>
	Thr	Man	*	+	-	-	Colágeno de caracoles
	Thr	GlcNAc	α	+	-	-	Dyctiostelium, <i>T. cruzi</i>
	Thr	GlcNAc	*	+	-	-	Proteínas Rho (GTPasas)
	Thr	Glc	*	+	-	-	Proteínas Rho (GTPasas)
	Thr	Gal	*	+	+	-	Capa-S de <i>H. halobium</i> , colágeno de gusanos de ventosa
	Hyl	Gal	β	+	-	-	Colágeno, complemento C1q, lectinas de núcleo
	Hyp	Ara	α	+	-	-	Pared celular de plantas
	Hyp	Ara	β	+	-	-	Lectinas de patata
	Hyp	Gal	β	+	-	-	Endospermo de trigo
	Hyp	GlcNAc	*	+	-	-	Proteínas citoplasmáticas de <i>Dyctiostelium</i>
	Tyr	Glc	α	+	-	-	Glicogeninas de hígado y músculo
	Tyr	Glc	β	-	-	+	Capa-S de <i>C. thermohydrosulfuricum</i>
	Tyr	Gal	β	-	-	+	Capa-S de <i>T. thermohydrosulfuricum</i>
C-manosilación	Trp	Man	α	+	-	-	RNasa 2, enterleucina 12, properdina
Fosfoglicosil	Ser	GlcNAc	α -1-P	+	-	-	Proteasas de <i>Dyctiostelium</i>
	Ser	Man	α -1-P	+	-	-	Fosfatasa ácida de <i>L. mexicana</i>
	Ser	Fuc	β -1-P	+	-	-	Proteínas de <i>Dyctiostelium</i>
	Ser	Xyl	*-1-P	+	-	-	Superficie celular de <i>T. cruzi</i>
Glipiación	Pr-C-(O)-EthN-6-P-Man			+	+	+	VSG de <i>T. brucei</i> , Thy-1, proteínas acidocárdicas de <i>Solfobolus</i>

Las abreviaturas Eucar., Arch., y Bacter., se refieren a Eucariota, Archaea y Bacteria respectivamente; El *, indica que la configuración del enlace glicopeptídico aún no ha sido establecida; Ser/Thr, indica que el enlace glicopeptídico se puede encontrar en uno u otro residuo; Pse se refiere a ácido Pseudoamínico; DiActrideoxihexosa, se refiere a 2,4-diacetamido-2, 4, 6-trideoxihexosa; las abreviaturas Hyl e Hyp, se refieren a hidroxilisina e hidroxiprolina, respectivamente.

I.3. Modificación de proteínas mediante *O*-GlcNAcilación

La *O*-GlcNAcilación es la adición de residuos de GlcNAc a través de un enlace de tipo *O*- a los grupos hidroxilo de Ser o Thr de las proteínas. Este tipo de modificación solo añade un único monosacárido al aminoácido que se modifica, al contrario de lo que ocurre en la mayoría de las proteínas glicosiladas en las que se añaden cadenas de polisacáridos. Como se ha comentado anteriormente, la *O*-GlcNAcilación está muy extendida y modifica desde proteínas de hongos filamentosos, algas, animales y plantas, hasta proteínas de parásitos de animales y virus que infectan células eucariotas (Fig. I.3).

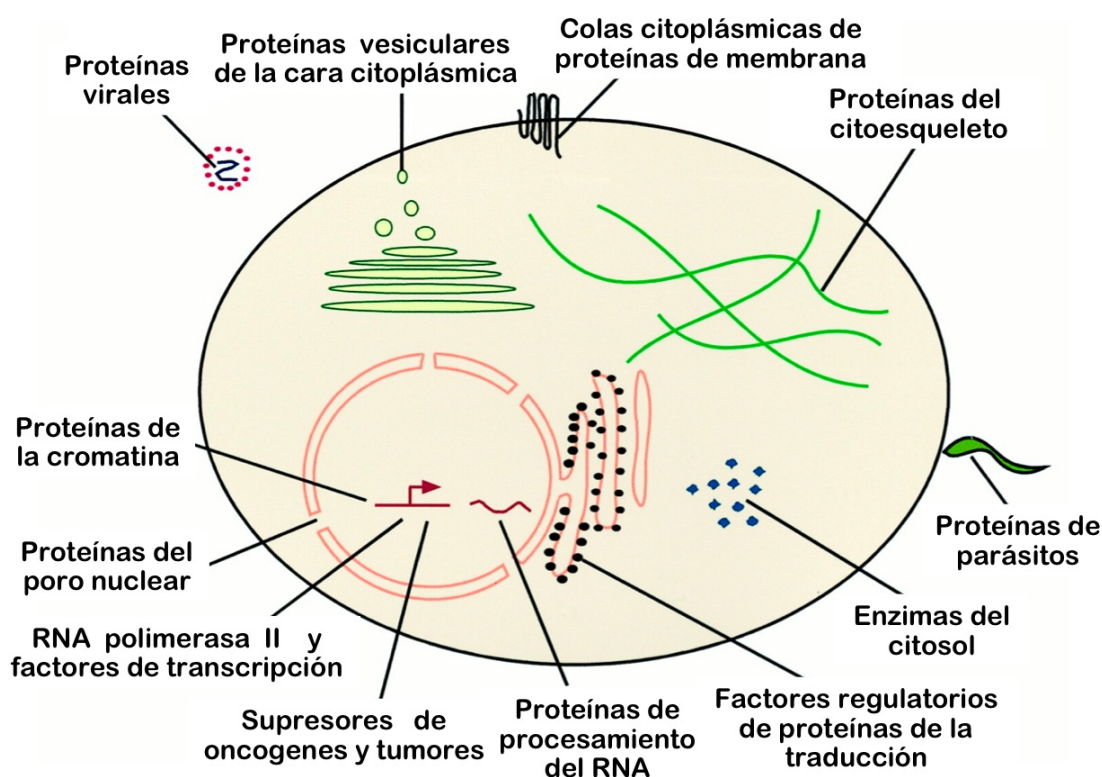


Figura I.3. Distribución celular de proteínas modificadas por residuos de *O*-GlcNAc. Modelo esquemático de la distribución de proteínas *O*-GlcNAcadas en la célula eucariota. También destaca la presencia de proteínas *O*-GlcNAcadas en parásitos y virus (Comer y Hart, 2000).

La *O*-GlcNAcilación es típica de proteínas nucleares y citoplasmáticas de células eucariotas pero también se ha encontrado en mitocondrias (He y col., 2010; Martinez-Fleites y col., 2010; Messner, 1997; Olszewski y col., 2010). En el diverso grupo de proteínas modificadas por *O*-GlcNAcilación se incluyen chaperonas, factores de transcripción, RNA polimerasa II, proteínas de poro nuclear, proteínas de unión a RNA, proteínas de la cromatina, quinasas y proteínas de citoesqueleto, entre otras (Fig. I.3) (Bond y Hanover, 2013). La

modificación de proteínas por *O*-GlcNAcilación se ha estudiado ampliamente en mamíferos, y, según la base de datos dbOGAP, se ha demostrado experimentalmente la *O*-GlcNAcilación de cerca de 800 proteínas en más de 80 organismos (<http://cbsb.lombardi.georgetown.edu/hulab/OGAP.html>, visitada el 4 de septiembre de 2013). Aunque no se ha encontrado una secuencia bien definida y específica para las dianas de *O*-GlcNAcilación, con la información de más de 400 sitios *O*-GlcNAcilados identificados en 172 proteínas se ha desarrollado un algoritmo de predicción de *O*-GlcNAcilación (<http://cbsb.lombardi.georgetown.edu/hulab/OGAP.html>, Wang y col., 2011). Merece la pena destacar que más del 50% de los sitios identificados como *O*-GlcNAcilados presentan el motivo Pro-Val-Ser similar al de las quinasas dirigidas por prolina, lo que sugiere una interrelación entre *O*-GlcNAcilación y fosforilación, de la que se hablará más adelante (ver apartado I.5) (Butkinaree y col., 2010). Además, muchos de los sitios *O*-GlcNAcilados se encuentran en secuencias tipo PEST (Pro-Glu-Ser-Thr) que están asociadas con rápida degradación de las proteínas que las contienen, lo que sugiere que la *O*-GlcNAcilación podría ralentizar o evitar la degradación (ver apartado I.6).

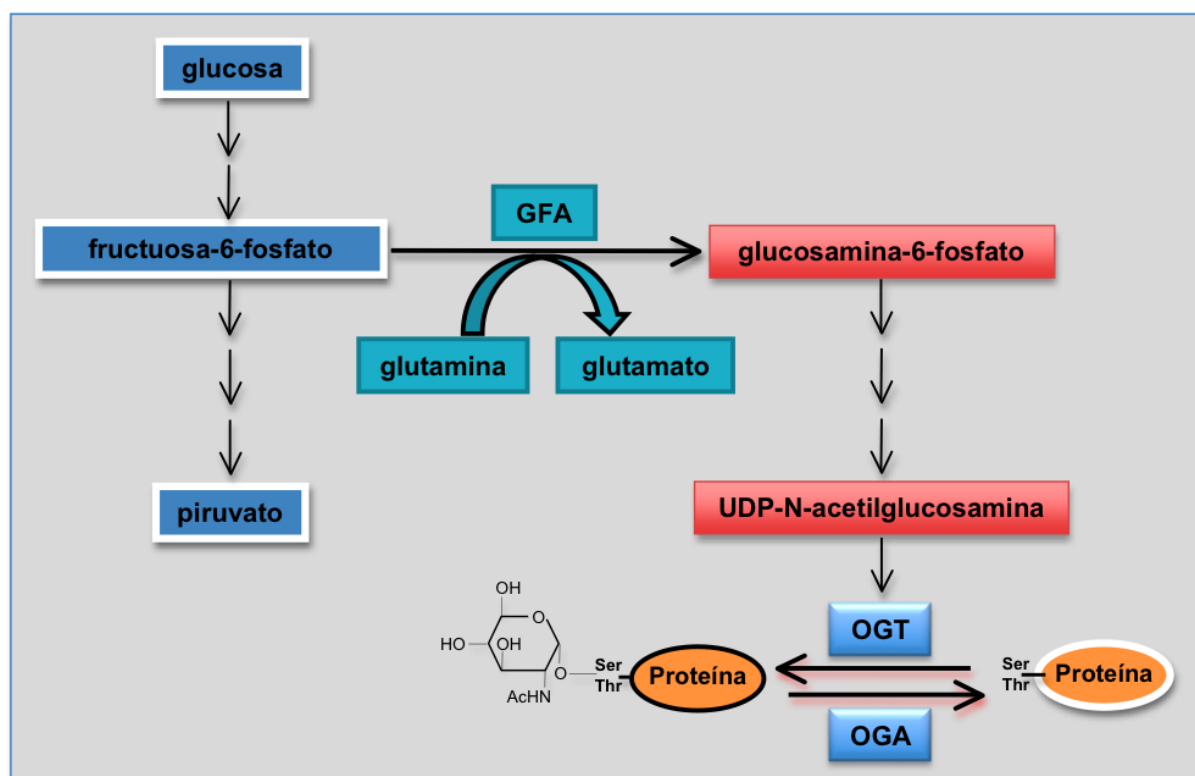


Figura I.4. El sustrato para la *O*-GlcNAcilación se origina a partir de productos de la vía de biosíntesis de hexosaminas. Se muestra la síntesis de UDP-*N*-acetilglucosamina y alguna de las enzimas implicadas en el proceso (GFA: glucosamina-fructosa-6-fosfato aminotransferasa). Además, se indican las enzimas que intervienen en el proceso de la *O*-GlcNAcilación de proteínas (OGT: *O*-GlcNAc transferasa y OGA: β -*N*-acetilglucosaminidasa) (Iyer y Hart, 2003).

Aunque el número de proteínas modificadas por *O*-GlcNAcilación en la célula es comparable con el de proteínas fosforiladas, al contrario de lo que ocurre con la fosforilación que se lleva a cabo por una gran variedad de enzimas celulares, solo dos enzimas controlan la adición y la eliminación de *O*-GlcNAc (Iyer y Hart, 2003). La enzima *O*-GlcNAc transferasa (OGT) que une GlcNAc a los residuos de serina y treonina y la β -*N*-acetilglucosaminidasa (*O*-GlcNAcase, OGA) que los elimina (Fig. I.4). Ambas enzimas son esenciales para la vida y su secuencia primaria está altamente conservada en eucariotas. El período de vida media de las modificaciones por *O*-GlcNAcilación suele ser más corto que el de otros tipos de modificaciones en proteínas, lo que indica un posible papel en la señalización celular, tal como ocurre con la fosforilación (Fang y Miller, 2001; Haltiwanger y col., 1998; Hanover y col., 2005; Hart y col., 2007; Holt y col., 1987; Kearse y Hart, 1991; Kreppel y col., 1997; Lazarus y col., 2006; Torres y Hart, 1984; Zachara y Hart, 2004).

I.4. Estructura y regulación de las enzimas del ciclo de la *O*-GlcNAcilación

Como se ha comentado anteriormente la OGT y la OGA son las dos enzimas que regulan el ciclo de adición y eliminación de *O*-GlcNAc en residuos de Ser/Thr en las proteínas *O*-GlcNAcyladas (Hanover y col., 2010). El gen de la OGT, está altamente conservado en animales, habiéndose identificado primero en humanos, en ratas y en *Caenorhabditis elegans* (Lubas y col., 1997; McClain y col., 2002), y posteriormente en *Arabidopsis* y *Giardia* (Banerjee y col., 2009; Jacobsen y col., 1996). Además, recientemente se han descrito la existencia de OGTs tanto en procariotas como en levaduras (Bouche y col., 2004; Olszewski y col., 2010). La delección del gen de la OGT produce una pérdida en la viabilidad de las células madre embrionarias (Shafi y col., 2000). Aunque en animales se ha encontrado un único gen para la OGT, en la célula se producen tres isoformas diferentes por splicing alternativo, una nucleocitoplasmática, otra de mitocondria y una versión corta. En la Fig. I.5 se muestran las tres isoformas y se indican los dominios que se han identificado. El gen de la OGA, también único, se ha caracterizado en humanos, en ratas, ratones y en *C. elegans* (Gao y col., 2001; Heckel y col., 1998). En *Arabidopsis* se han identificado dos genes que codifican a dos diferentes OGTs de los que se hablará más adelante (Jacobsen y col., 1996).

La actividad enzimática de la OGT se regula por muchos y muy variados mecanismos, tales como la regulación de los niveles de expresión de su mRNA y su posterior splicing, la disponibilidad del sustrato donador (UDP-*N*-acetilglucosamina), la oligomerización e

interacción con otras proteínas, la disponibilidad de nutrientes o las modificaciones postraduccionales de la proteína blanco y de la misma OGT (tanto por *O*-GlcNAcilación como por fosforilación) (Butkinaree y col., 2010; Cheung y Hart, 2008).

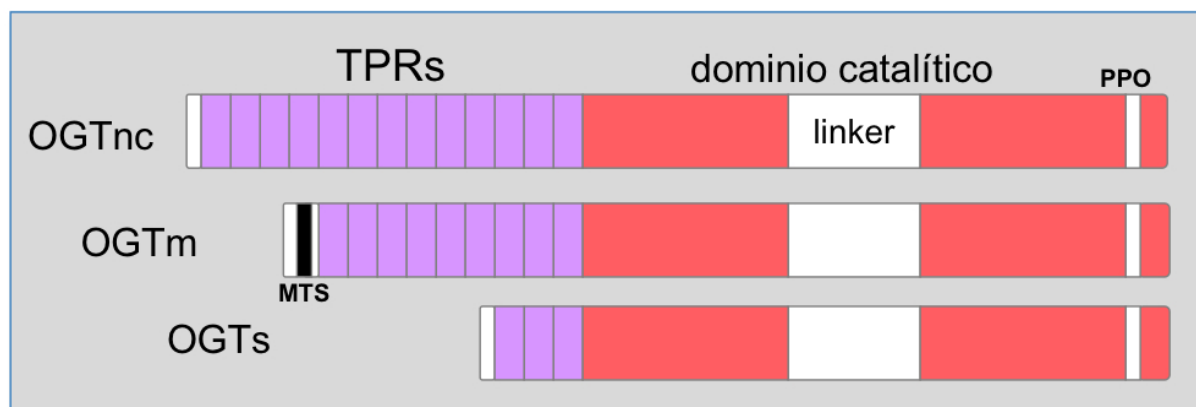


Figura I.5. Estructura de las isoformas de las OGT de mamíferos producidas por splicing alternativo. Se señalan en color morado las repeticiones de tetratricopéptidos (TPRs) que reconocen las proteínas que van a modificarse. En la OGT mitocondrial (OGTm) se indica en color negro la señal de localización mitocondrial (MTS). El dominio catalítico *O*-glicosil transferasa esta conformado en dos segmentos, señalados en color rojo, unidos por una región central en color blanco (linker). Además en el extremo C-terminal se señala en color blanco un sitio de unión a membranas celulares con lípidos ricos en fosfato de inositol (PPO). OGTnc: OGT nucleocitoplasmática; OGTs: isoforma corta de la OGT. (Hanover y col., 2010).

Las OGAs también se encuentran altamente conservadas en eucariotas, principalmente en mamíferos (Bouche y col., 2004; Olszewski y col., 2010). En mamíferos, tal y como ocurre con la OGT, también se han descrito isoformas de la OGA que se producen por splicing alternativo: la isoforma larga y la corta cuyos dominios se muestran en la Fig. I.6 (Butkinaree y col., 2010). Se conoce muy poco aún de la regulación de ambas enzimas, hay indicios de que un procesamiento proteolítico llevado a cabo por la caspasa-3 durante la apoptosis y modificaciones postraduccionales como la *O*-GlcNAcilación y fosforilación, que modifican también la OGT, podrían regular su actividad enzimática en la célula (Beausoleil y col., 2004; Butkinaree y col., 2008; Dunker y col., 2002; Khidekel y col., 2007; Wells y col., 2002). Por otro lado, se ha observado, mediante experimentos de doble híbrido en levaduras y experimentos *in vivo* con células de mamífero, la formación de complejos transitorios entre la OGT y la OGA asociados a quinasas y fosfatasa, cuya actividad y presencia varían en respuesta a ciertas condiciones o procesos celulares específicos, que podrían de alguna manera regular los ciclos de glicosilación/desglicosilación (Butkinaree y col., 2010; Slawson y col., 2008).

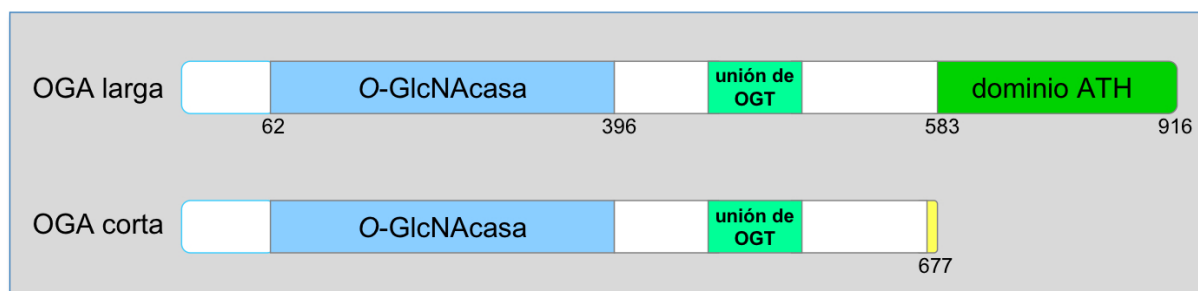


Figura I.6. Estructura de las dos isoformas de la *O*-GlcNAcase de mamíferos producidas por splicing alternativo. En color azul se indica el dominio catalítico *O*-GlcNAcase. En la región central se señala en color verde claro un motivo de interacción con la OGT (unión de OGT). En la OGA larga se señala en color verde oscuro un dominio acetiltransferasa de histonas (dominio ATH) que contiene una secuencia interna de localización nuclear. En la OGA corta se indica en color amarillo, en su extremo C-terminal, una secuencia de 15 aminoácidos que difiere de la OGA larga. Los números indican el aminoácido correspondiente de la proteína. (Butkinaree y col., 2010).

I.5. Interrelación entre la *O*-GlcNAcilación y la fosforilación de proteínas

Aunque las proteínas *O*-GlcNAcizadas son funcionalmente muy diversas, aquellas que se han estudiado más en detalle han revelado dos rasgos en común: también se fosforilan y además forman complejos multiméricos reversibles con otros polipéptidos mediante asociaciones que se regulan por fosforilación (Hiromura y col., 2003). Además, en los últimos años se han obtenido datos que muestran que la *O*-GlcNAcilación y la fosforilación se afectan una a la otra, es decir, ciertas situaciones que alteran la fosforilación afectan también los niveles de *O*-GlcNAcilación y viceversa. Las recientes aplicaciones de nuevos métodos de espectrometría de masas para detectar modificaciones por *O*-GlcNAc y los métodos tradicionales de análisis de fosforilación han mostrado que la interrelación dinámica entre *O*-GlcNAcilación y fosforilación está muy extendida (Wang y col., 2011; Wang y col., 2008; Wang y col., 2007). Y a veces, la OGT y las proteínas fosfatasas se encuentran en el mismo complejo, lo que indica que en estos casos el mismo complejo enzimático que añade *O*-GlcNAc elimina a su vez el residuo de fosfato (Wells y col., 2004). Ambas modificaciones pueden competir por el mismo aminoácido y se les conoce como sitios yin-yang (Blom y col., 1999; Blom y col., 2004). En este sentido, la modificación por *O*-GlcNAc en muchas proteínas puede ser recíproca a la fosforilación como ocurre con alguno de los sitios de la RNA polimerasa II, el receptor β de estrógenos y el oncogén c-Myc (Hart y col., 2007; Yang y col., 2006; Zeidan y Hart, 2010). También pueden modificar residuos adyacentes, en este caso la modificación por *O*-GlcNAcilación y fosforilación de uno puede afectar o no a la modificación de otro proximal. En el caso del factor de transcripción p53, se observó que la

O-GlcNAcilación puede afectar su fosforilación (Yang y col., 2006). La identificación de sitios con *O*-GlcNAc o fosfato sugiere que hay al menos cuatro tipos dinámicos de interrelación entre ambas modificaciones. Primero, hay competición en la ocupación por el mismo sitio, segundo competición y ocupación alternativa en sitios adyacentes. Tercero, hay una compleja relación donde la unión de fosfatos unidos a determinados sitios en una proteína son los mismos que los sitios de unión de *O*-GlcNAc, mientras que otros son adyacentes o incluso distantes. También hay casos que no pueden ser asignados a ninguno de los anteriores y que necesitan definirse. Esta dinámica y compleja interrelación entre *O*-GlcNAc y fosfato requiere que se modifique el actual dogma con respecto a la señalización celular. Claramente, el sistema no es binario con un estado ‘activo’ y otro ‘inactivo’ para cada molécula. Más bien,

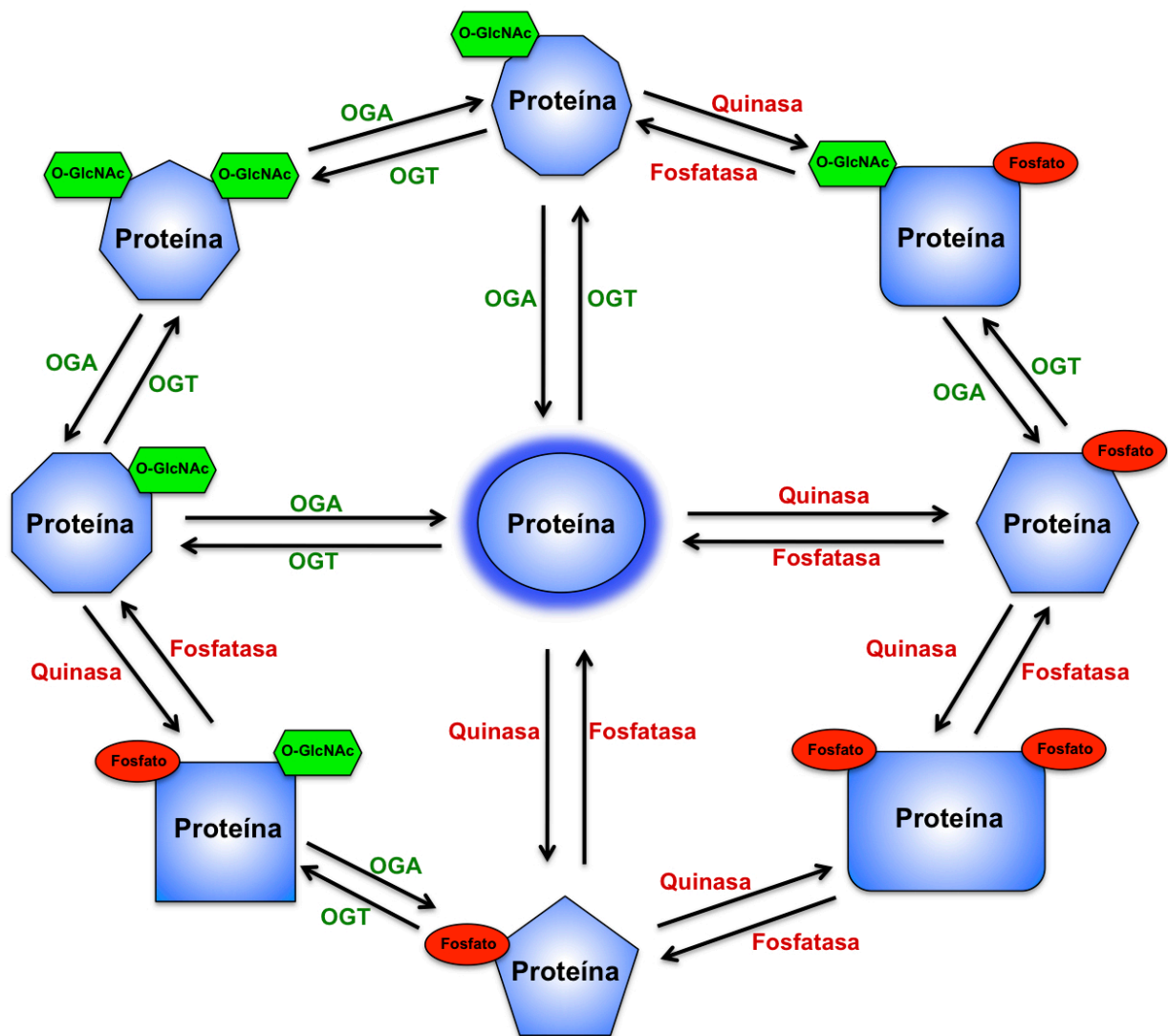


Figura I.7 Interrelación entre la *O*-GlcNAcilación y la *O*-fosforilación de proteínas. Diagrama hipotético de la diversidad molecular que potencialmente se crea por la modificación recíproca de dos sitios que se modifican por *O*-GlcNAcilación y fosforilación (Slawson y Hart, 2003).

la combinación de ambas modificaciones, que están diferencialmente reguladas, produce una enorme diversidad molecular que permite un control casi analógico de las funciones de una proteína (Fig. I.7). El grado de ocupación de múltiples sitios por cada una de las modificaciones puede proporcionar rápidamente un umbral continuo para que se establezcan las interacciones moleculares necesarias en una determinada situación dentro de la célula.

I.6. Funciones de la modificación de proteínas por *O*-GlcNAcilación

Después de tres décadas desde el descubrimiento de una modificación tan abundante y extendida como la *O*-GlcNAcilación, que afecta a un gran número de las proteínas reguladoras de la célula, los datos que se han obtenido para entender sus funciones son aún limitados. Esto es en gran parte debido a la falta de métodos y herramientas para el estudio de esta modificación y al bajo número de investigadores en este área de investigación. Sin embargo, se han identificado varias funciones en las que interviene este tipo de modificación y las cuales se detallan a continuación:

Interacción proteína-proteína, transcripción y traducción. Está ampliamente aceptado que los residuos fosforilados son determinantes estructurales en las interacciones proteína-proteína (Pawson y Nash, 2003). Del mismo modo, la *O*-GlcNAcilación podrían mediar las interacciones proteína-proteína, en este sentido merece la pena destacar que muchas proteínas *O*-GlcNAciladas son oligoméricas (Hiromura y col., 2003). Asimismo, la *O*-GlcNAcilación juega un papel relevante en las proteínas que sirven de puente en la formación del citoesqueleto (Hart y col., 2011). En el caso de la RNA polimerasa II y de la mayoría de los factores de transcripción, la *O*-GlcNAcilación potencia el ensamblaje del complejo de pre-iniciación y estimula la transcripción en general, aunque también tiene efectos más específicos, activadores o represores, sobre algunos promotores (Gewinner y col., 2004; Majumdar y col., 2003; Roos y col., 1997). La *O*-GlcNAcilación es también frecuente en proteínas de la cromatina y contribuye a la regulación de la segregación cromosómica durante la mitosis (Sakabe y Hart, 2010). Por otra parte, datos recientes apuntan a que esta modificación postraducciona juega un papel importante en la regulación de la traducción y de la biogénesis de los ribosomas (Zeidan y col., 2010).

Degradación de proteínas. Otro posible papel regulador de la *O*-GlcNAcilación es el control de la degradación de las proteínas. Las proteínas con dominios ricos en prolinas, glutaminas, serinas y treoninas (PEST), se han propuesto como dianas de degradación en el

proteasoma señalizada por ubiquitina. En este sentido, muchos sitios *O*-GlcNAcilosados que se localizan en secuencias PEST protegen a la proteína de su degradación, mientras que la fosforilación de estos sitios aumenta la inestabilidad de la proteína (Martinez y col., 2003; Rechsteiner y Rogers, 1996). En el caso de otras proteínas celulares modificadas recíprocamente por residuos de *O*-GlcNAc y fosfato, es también la forma fosforilada de la proteína la que es rápidamente dirigida para su degradación mientras que la forma *O*-GlcNAcificada se degrada mucho más lentamente (Cheng y Hart, 2001). Además, la modificación por *O*-GlcNAcificación de varias de las subunidades catalíticas y reguladoras del proteasoma inhibe su capacidad para degradar ciertas proteínas. Esta capacidad de regulación de la vida media de las proteínas hace que la *O*-GlcNAcificación pueda ejercer un efecto temporal en muchos procesos celulares (Zhang y col., 2003).

Señalización celular. La transducción de señales del exterior al interior celular y las adaptaciones que la célula lleva a cabo en respuesta a estas señales dictan la supervivencia y la diferenciación de la célula. A menudo estas señales se transmiten mediante modificaciones postraduccionales dinámicas tales como la fosforilación y la proteólisis. Cada vez hay más evidencias de que la *O*-GlcNAcificación es una modificación reversible preparada para integrar señales metabólicas e influir en procesos celulares. Se ha observado que algunos factores como la respuesta a nutrientes o el estrés celular alteran de una manera rápida y transitoria los niveles celulares de *O*-GlcNAc, que seguramente son necesarios para llevar a cabo modificaciones de la actividad de determinadas proteínas o de la transcripción de determinados genes (Griffith y Schmitz, 1999; Kearsy y Hart, 1991). De alguna manera, la *O*-GlcNAcificación actúa como un reóstato para modificar procesos celulares que ajustan la disponibilidad de nutrientes y el estrés celular. En este sentido, estudios recientes han demostrado que alteraciones en la *O*-GlcNAcificación causan serios efectos que conducen al desarrollo de enfermedades tales como cáncer, diabetes y neurodegeneración (Bond y Hanover, 2013; Forsythe y col., 2006; Hanover y col., 2005; Shafi y col., 2000).

I.7. La *O*-GlcNAcificación de proteínas en plantas

En plantas, las modificaciones de proteínas por glicanos modulan muchos procesos celulares, como pueden ser la embriogénesis (van Hengel y col., 2001), el crecimiento, el desarrollo (Benfey y col., 1993; Schindelman y col., 2001; Sedbrook y col., 2002), así como la muerte celular programada (Majewska-Sawka y Nothnagel, 2000). Aunque existen pocos datos acerca de la modificación de Ser/Thr por residuos de *O*-GlcNAc, está claramente

confirmado que también tiene lugar en las proteínas de plantas (Hartweck y col., 2002; Heese-Peck y col., 1995; Thornton y col., 1999). La *O*-GlcNAcilación parece afectar a diversos procesos en plantas, como respuesta a hormonas y señales ambientales, ritmos circadianos, vernalización, desarrollo, y transporte intercelular (Olszewski y col., 2010; Xing y col., 2009). Los primeros datos de *O*-GlcNAcilación de proteínas vegetales se obtuvieron en plantas de *Nicotiana tabacum* donde se determinó la existencia de modificaciones por *O*-GlcNAc en proteínas del complejo del poro nuclear y proteínas periféricas del núcleo (Heese-Peck y col., 1995; Heese-Peck y Raikhel, 1998). Se ha comprobado que la proteína de tabaco NON-CELL-AUTONOMOUS PATHWAY PROTEIN 1 y varias proteínas sin autonomía celular (non-cell autonomous proteins, NCAPs) de *Cucurbita máxima* estaban fosforiladas y *O*-GlcNAciladas. Un estudio más detallado de una proteína NCAP, CmPP16-1, permitió identificar un residuo de serina que podría ser diana de fosforilación y de *O*-GlcNAcilación (Taoka y col., 2007). Más recientemente se ha demostrado, en tabaco, la existencia de histonas *O*-GlcNAciladas que interaccionan con la lectina Nictaba, que se induce por tratamientos con ácido jasmónico o por el ataque por insectos, lo que hace sugerir que Nictaba y las histonas *O*-GlcNAciladas participarían en la señalización que se origina por estos tipos de estrés (Schouppe y col., 2011). Son todavía muy pocas las proteínas *O*-GlcNAciladas que se han identificado hasta el momento en plantas, una de las principales razones es que no es fácil trabajar con este tipo de proteínas porque no se han desarrollado buenos métodos para su detección.

I.8. Estructura de las OGTs de plantas y funciones en las que participan

La investigación de la *O*-GlcNAcilación en plantas se inició con el estudio de componentes de la respuesta de la planta a las giberelinas. Estas hormonas vegetales controlan numerosos procesos que incluyen germinación, crecimiento, floración y desarrollo de la semilla (Hartweck, 2008). Análisis de plantas deficientes en la respuesta a giberelinas identificaron un gen que se denominó SPINDLY (SPY) (Jacobsen y Olszewski, 1993; Silverstone y col., 2007; Wilson y Somerville, 1995). En un principio se propuso que la proteína SPY era un represor de la señalización de giberelinas, pero más tarde se comprobó, que las plantas mutantes *spy* también tenían defectos en la respuesta a luz, actividad del meristemo, crecimiento de la raíz, ritmo circadiano y respuesta a citoquininas, que no están causados por defectos en la señalización por giberelinas (Olszewski y col., 2010).

Como ya se ha comentado anteriormente, al contrario de lo que ocurre en animales que solo tienen una única OGT y en hongos, que tienen una o ninguna, los musgos y las plantas vasculares contienen dos OGTs. Después de la identificación de SPY, se identificó una segunda OGT de *A. thaliana* se denominó SECRET AGENT (SEC). Mientras SEC muestra una organización y una función muy similar a las OGTs de mamíferos, SPY está más relacionada con las OGTs de levaduras y bacterias (Hanover y col., 2010; Hartweck y col., 2002; Kreppel y col., 1997; Lubas y col., 1997; Olszewski y col., 2010; Thornton, 2001). La estructura de la OGTs de plantas, muestra en la región N-terminal el sitio de reconocimiento de las proteínas diana, que está formado por una serie de repeticiones de tetratricopéptidos. En la región C-terminal de ambas proteínas se encuentra el sitio catalítico *O*-glicosil transferasa. Finalmente, se ha identificado un sitio de unión a fosfolípidos de membrana que se encuentra en el extremo C-terminal de ambas OGTs (Fig. I.8). El análisis filogenético de las OGTs identificadas hasta el momento ha llevado a proponer que las secuencias de SEC y SPY de plantas se originaron a partir de una duplicación génica (Olszewski y col., 2010).

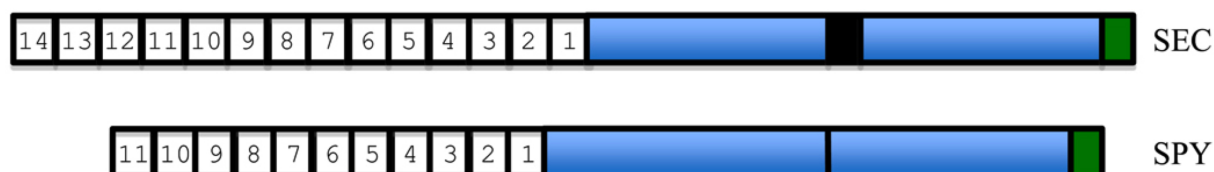


Figura I.8. Organización estructural de las dos OGTs de *A. thaliana* SEC y SPY. Las cajas numeradas indican las repeticiones de tetratricopéptidos. Las cajas de color azul indican las dos regiones que forman el dominio catalítico. La caja de color negro en SEC indica la localización de una inserción de longitud variable entre los dominios catalíticos. La región de color verde indica la región de unión a fosfolípidos (Olszewski y col., 2010).

En plantas, la pérdida de la función SPY o SEC por separado no causa letalidad, aunque los efectos de la pérdida de SPY son más notables que los de la pérdida de SEC. Sin embargo, el doble mutante *sec/spy* muere durante la embriogénesis lo que indica que la actividad OGT es esencial para la viabilidad de la planta y que SEC y SPY tienen al menos una actividad esencial solapante, muy probablemente en la modificación de proteínas. A pesar de la relevancia de la *O*-GlcNAcilación en los procesos fisiológicos de las plantas, aún no se conocen las bases moleculares de los procesos específicos que resultan afectados cuando la actividad OGT se altera. Uno de los mayores impedimentos es el desconocimiento de la mayoría de las proteínas que se modifican por *O*-GlcNAcilación.

I.9. Modificación por *O*-GlcNAcilación de proteínas virales

La *O*-GlcNAcilación también se ha descrito en varias proteínas virales estructurales y no estructurales, aunque en la mayoría de los casos su función aún no se conoce. Al contrario de otras formas glicosiladas de proteínas virales, que residen en la superficie de los virus, las proteínas *O*-GlcNAciladas están mayoritariamente localizadas en las proteínas que rodean los ácidos nucleicos de los virus. Por ejemplo, una proteína mayoritaria del tegumento, la fosfoproteína básica del citomegalovirus humano está *O*-GlcNAcilada en múltiples sitios (Greis y col., 1994). Una proteína estructural, la proteína gp41 de baculovirus también contiene residuos *O*-GlcNAc, que no están expuestos en la superficie del virión (Whitford y Faulkner, 1992). En el caso de una proteína de la cápside (CP) de adenovirus, la proteína fiber, la *O*-GlcNAcilación parece jugar un papel en su ensamblaje o estabilización (Mullis y col., 1990).

También hay ejemplos de proteínas virales no estructurales *O*-GlcNAciladas tales como la proteína NS26 de rotavirus (Gonzalez y Burrone, 1991), el antígeno T de SV40 (Medina y col., 1998) y la oncoproteína v-Erb-a codificada por el virus de la eritroblastosis aviar (Privalsky, 1990). Recientemente se ha demostrado que la *O*-GlcNAcilación del activador de la replicación y de la transcripción K-RTA del herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi favorece su interacción con la proteína celular PARP1, que inhibe su actividad (Ko y col., 2012).

En el caso de virus de plantas, la CP del virus de la sharka (*Plum pox virus*, PPV), objeto de estudio de esta tesis, es la única proteína modificada por *O*-GlcNAcilación descrita hasta el momento (Fernández-Fernández y col., 2002a).

I.10. La sharka, una enfermedad de árboles del género *Prunus*

Plum pox virus (PPV), produce la sharka, la enfermedad más devastadora de árboles del género *Prunus* en Europa. Esta enfermedad produce graves pérdidas económicas en cosechas de albaricoque, melocotón y ciruela, ya que perjudica la calidad y causa la caída prematura de los frutos (López-Moya y col., 2000). El PPV se transmite en la naturaleza por diferentes especies de pulgones de manera no persistente, aunque la introducción de plantas y/o material infectado es la manera más común de propagación a grandes distancias (Cambra y col., 2006; García y Cambra, 2007; Roy, 1994). La sharka se describió por primera vez en Bulgaria, alrededor de 1917, en ciruelos, y se reconoció como una enfermedad viral por

Atanassof (1932). Progresivamente, esta epidemia se ha ido extendiendo a lo largo de la cuenca del Mediterráneo, a gran parte de Europa, Oriente Próximo y Oriente Medio. También se encuentra en la India y en algunos países americanos como Canadá, Estados Unidos, Chile y Argentina (Barba y col., 2011; García y Cambra, 2007). Además, el PPV tiene un amplio espectro de huéspedes experimentales herbáceos tales como *Chenopodium foetidum*, *Pisum sativum*, *A. thaliana* y varias especies de *Nicotiana* (Llácer, 2006).

I.11. Genoma y expresión génica del PPV

El PPV está incluido en la familia *Potyviridae* (Adams y col., 2012; López-Moya y García, 2008; López-Moya y col., 2009) en el género *Potyvirus* que es el más numeroso e incluye aproximadamente el 30% de todos los virus de plantas, muchos de los cuales producen grandes pérdidas agrícolas y económicas a nivel mundial. El genoma del PPV consiste en una hebra de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva de 9741 a 9795 nt (García y col., 2013; SharCo database, <http://w3.pierroton.inra.fr:8060/> visitada el 5 de Septiembre de 2013). Se han identificado ocho cepas del PPV, D (Dideron), M (Marcus), EA (El Amar), C (Cherry), CR (Cherry Russian), W (Winona), T (Turkey) y Rec (Recombinant). Esta clasificación está basada tanto en características serológicas, como en propiedades moleculares de cada grupo, dentro de las cuales PPV-M y PPV-D son las más ampliamente distribuidas (Bodin y col., 2003; Crescenzi y col., 1997; Glasa y col., 2005; James y Varga, 2005; Kerlan y Dunez, 1979; Ulubaş Serçe y col., 2009).

El RNA genómico tiene una proteína (VPg) unida a su extremo 5' y un extremo 3' poliadenilado (Riechmann y col., 1989). El genoma se encapsida en viriones alargados y flexibles de un tamaño aproximado de 750 x 20 nm (Glasa y Candresse, 2005). Los viriones están formados por unas 2000 unidades de un único tipo de proteína, la proteína CP, dispuesta de forma helicoidal (Shukla y col., 1994). Sin embargo, también se han encontrado niveles detectables de otra proteína viral, HCPro, asociada a los viriones del PPV (Manoussopoulos y col., 2000). Esta asociación podría estar relacionada con la capacidad de HCPro de actuar como puente entre las partículas virales y el estilete de los pulgones que transmiten al virus (Blanc y col., 1997; López-Moya y col., 1995; Roudet-Tavert y col., 2002). Aunque también se han propuesto otras funciones para esta asociación que no están relacionadas con la transmisión por pulgones (Roudet-Tavert y col., 2002).

La mayoría del RNA genómico codifica una larga fase de lectura abierta que se traduce como una poliproteína de unos 355 kDa, que empieza desde el segundo codón AUG

(nt 147-149) (Riechmann y col., 1991; Simón-Buela y col., 1997). Esta poliproteína se autoprocresa proteolíticamente mediante tres proteasas codificadas por el virus, de las cuales P1 y HCPro cortan en *cis*, y NIaPro corta tanto en *cis* como en *trans*, para producir al menos 10 productos maduros: P1, HCPro, P3, 6K1, CI, 6K2, NIa-VPg, NIaPro, NIb y CP (Fig. I.9). Además, como se ha propuesto para otros potyvirus, otra proteína del PPV, P3N-PIPO se produciría por un cambio de fase (+2) a partir de una fase de lectura abierta corta que está incluida en la secuencia que codifica a la proteína P3 (Chung y col., 2008).

La replicación del PPV tiene lugar en asociación con membranas intracelulares, probablemente derivadas del retículo endoplasmático (Martin y Garcia, 1991). En estas estructuras, el RNA potyviral se replica por la replicasa del virus, la proteína NIb (Hong y Hunt, 1996) utilizando como iniciador la proteína VPg uridilada por la misma polimerasa. Otros factores virales que se necesitan para la replicación del PPV son: la helicasa de RNA CI (Fernandez y col., 1997) y el factor 6K2, que dirige el anclaje a las membranas del complejo de replicación (Beauchemin y col., 2007; Restrepo-Hartwig y Carrington, 1994). Además, la proteína NIa interacciona con la proteína NIb (Fellers y col., 1998; Li y col., 1997) y con RNA (Daròs y Carrington, 1997), pudiendo servir como soporte de estos productos durante el proceso. Otras proteínas posiblemente implicadas son las proteínas P1, que parece ser un factor importante para la adaptación del virus a sus huéspedes particulares (Valli y col., 2007) y P3 (Klein y col., 1994; Rodriguez-Cerezo y col., 1993; Verchot y Carrington, 1995).

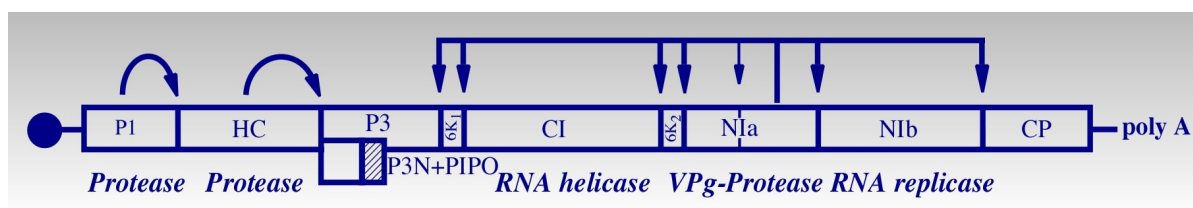


Figura I.9. Esquema del procesamiento proteolítico de la poliproteína codificada por el RNA genómico del PPV. El diagrama muestra el mapa y la organización del genoma viral. Se indica con cajas la posición de cada una de las proteínas maduras. Debajo se indican alguna de las funciones de las proteínas maduras. Las flechas curvas indican los sitios de corte de P1 y HCPro. Las flechas verticales indican los 7 sitios de corte llevados a cabo por la proteasa NIaPro. El círculo de color azul representa la VPg unida al extremo 5' del genoma. En el extremo 3' del genoma se indica la cola poliadenilada (poly A).

Recientemente se han publicado varias revisiones que describen en detalle las propiedades biológicas del PPV (García y col., 2013; Sochor y col., 2012; Šubr y Glasa, 2013).

El trabajo que se describe en esta memoria, está enfocado en la CP del PPV. La principal función de la CP es la ensamblaje de las partículas virales que protegen al genoma viral. En la secuencia de la CP de los potyvirus se distinguen tres dominios, un dominio central conservado que es esencial para el ensamblaje del virión (Shukla y col., 1988; Varrelmann y Maiss, 2000), así como para la interacción con los plasmodesmos (Rojas y col., 1997), y el movimiento célula a célula (Dolja y col., 1994; Dolja y col., 1995). Y por otro lado, los dominios N- y C-terminal que están expuestos en la superficie del virión y son altamente inmunogénicos (Allison y col., 1985; Shukla y col., 1994; Voloudakis y col., 2004).

El dominio N-terminal de la CP presenta gran variabilidad y está implicado en el movimiento a larga distancia (Andersen y Johansen, 1998; Andrejeva y col., 1999; Carbonell y col., 2013; Dolja y col., 1994; López-Moya y Pirone, 1998). Se ha comprobado que más que una secuencia de aminoácidos específica, las características necesarias de este dominio para el movimiento viral son una apropiada carga neta y una disposición estructural adecuada (Kimalov y col., 2004; López-Moya y Pirone, 1998). Sin embargo, determinadas secuencias específicas de esta región también son relevantes para la adaptación del virus a diferentes huéspedes (Carbonell y col., 2013; Salvador y col., 2008a). La alta inmunogenicidad y la falta de requerimientos estrictos en la secuencia de aminoácidos hacen del extremo N-terminal de CP un sitio muy apropiado para utilizarse como presentador de antígenos en la preparación de vacunas recombinantes (Fernández-Fernández y col., 1998; Fernández-Fernández y col., 2002b). En la región N-terminal de la CP existen tres residuos conservados, Asp-Ala-Gly, que participan en la interacción con HCPro y son esenciales en la transmisibilidad por pulgones (Atreya y col., 1990; Atreya y col., 1991; Blanc y col., 1997; Seo y col., 2010), aunque otras regiones de la CP pueden también participar en esta interacción (Dombrovsky y col., 2005; Roudet-Tavert y col., 2002; Seo y col., 2010). En la naturaleza aparecen espontáneamente virus con una delección de 15 aminoácidos en la región N-terminal de la CP que afecta la triada Asp-Ala-Gly (mutantes NAT: Non-Aphid Transmissible) (López-Moya y col., 1995; Maiss y col., 1992). Esta delección parece que está asociada al paso del virus a especies herbáceas, y aunque no elimina la capacidad de infectar a los huéspedes naturales del género *Prunus* sí que causa una disminución de la eficacia biológica del virus en estas plantas (Salvador y col., 2008b).

Hace un tiempo se describió la interacción entre la CP del potyvirus PVY con la subunidad grande del complejo RuBisCO (Feki y col., 2005). Recientemente se ha descrito la importancia de la subunidad pequeña de este complejo en el movimiento de los tobamovirus y en la resistencia mediada por el gen de resistencia Tm-2² (Zhao y col., 2013). Por tanto, existe

la posibilidad de que también la interacción de la CP de los potyvirus con RuBisCO desempeñe un papel en el movimiento viral y en respuestas defensivas de la planta.

Especialmente relevante para los objetivos de esta tesis es que en nuestro laboratorio se observó por primera vez, la existencia modificaciones postraduccionales que afectaban a la CP del PPV. Mediante análisis de western, se observaron fosforilaciones en serinas y/o treoninas de la CP del PPV (Fernández-Fernández y col., 2002a), como ya se había observado para la CP de otro potyvirus, el *Potato virus A* (Ivanov y col., 2003; Ivanov y col., 2001). Además, se detectó mediante un marcaje específico para proteínas glicosiladas con UDP-[³H]galactosa, que la CP del virión presentaba modificaciones por carbohidratos, y se confirmó mediante análisis de espectroscopia de masas que tal modificación ocurría en la región N-terminal de la CP, por residuos de N-acetilglucosamina que se unían mediante un enlace de tipo *O*-glicosídico. La *O*-GlcNAcilación de la CP y su papel durante la infección viral por el PPV han sido el objeto de estudio de esta tesis y para la cual se plantearon los objetivos que se enuncian en el siguiente capítulo.

Se ha propuesto que las modificaciones postraduccionales pueden ser elementos de control para regular la fracción de RNA genómico que se destina a la traducción, replicación y propagación durante las diferentes etapas del proceso de infección (Ivanov y col., 2003). Las chaperonas celulares parecen desarrollar un papel fundamental en esta regulación (Aparicio y col., 2005; Hafrén y col., 2010; Hofius y col., 2007; Sugio y col., 2009). La CP de los potyvirus tiene actividad NTPasa, y es probable que esta actividad también sea relevante en el mecanismo regulador (Rakitina y col., 2005).

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Partiendo de la base de que las modificaciones postraduccionales de la CP pueden desempeñar mecanismos reguladores de gran importancia en el proceso de infección de los potyvirus, en esta tesis nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

- 1.- Identificar la(s) enzima(s) OGT(s) implicada(s) en la *O*-GlcNAcilación de la CP del PPV.
- 2.- Identificar los residuos de la CP del PPV modificados por *O*-GlcNAcilación.
- 3.- Determinar el papel de la *O*-GlcNAcilación de la CP en la infección del PPV.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. MATERIAL BIOLÓGICO

III.1.1. Plantas

Los ensayos para identificar la OGT que *O*-GlcNAcila a la CP del PPV se llevaron a cabo en *A. thaliana*. Se usaron los ecotipos de *A. thaliana* silvestres Columbia-0 (Col-0) y Wassilewskija (WS), además de los mutantes *sec-2* y *spy-3* de Col-0 y *sec-1* de WS (Hartweck y col., 2002). Las semillas de los mutante se obtuvieron del laboratorio del Dr. Neil Olszewski (Universidad de Minnesota).

Los ensayos de infectividad viral y la determinación de la sintomatología del PPV y sus mutantes se llevaron a cabo en los ecotipos de *A. thaliana* Col-0 y Landsberg erecta (*Ler*), las especies herbáceas *Nicotiana clevelandii* y *Nicotiana benthamiana*, y el huésped leñoso *Prunus persica* cv GF305.

Para la transformación genética de plantas con las repeticiones invertidas (IR) de un fragmento altamente conservado de los genes de SEC (*SEC-b2* y *SEC-b3*), provenientes de *N. benthamiana*, se utilizaron discos de hoja de plantas de esta especie.

Las semillas de las plantas transgénicas de *N. benthamiana* germinaron *in vitro*, en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con 1% de sacarosa y 100 mg/l de kanamicina. Las semillas de plantas no transgénicas germinaron en el mismo medio sin antibiótico. Después de dos semanas de incubación en cámaras de ambiente controlado con 14 h de luz artificial (5500 luxes) a 24 °C, las plántulas se transfirieron a una mezcla 3:1 de tierra:vermiculita y se cultivaron en un invernadero, con 67-70% de humedad relativa, fotoperiodo de 16 horas de luz y 19-23 °C de temperatura. Las semillas de *Arabidopsis* germinaron en tierra altamente humedecida, después de ser sometidas a vernalización por 48 horas a 4 °C en oscuridad. Posteriormente se transfirieron a una cámara de ambiente controlado con una humedad relativa del 50-60%, fotoperiodo de 12 horas de luz artificial (4500-5500 luxes de intensidad lumínica) y 22 °C de temperatura.

III.1.2. Bacterias y plásmidos

III.1.2.1. Bacterias

Para la propagación de los plásmidos empleados en las distintas clonaciones se utilizó la cepa DH5 α de *Escherichia coli* (Sambrook y col., 1989). Para los experimentos de expresión transitoria por agroinfiltración y para la obtención de plantas transgénicas, se utilizó la cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* (Van Larebeke y col., 1974).

Las cepas DH5 α de *E. coli* y C58C1 de *A. tumefaciens* se cultivaron a 37 °C y 28 °C, respectivamente, en medio LB (bacto-triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y cloruro de sodio 10 g/l), al que se añadieron 18 g/l de agar para los cultivos en medio sólido.

Las células DH5 α competentes, preparadas por el método de Inoe y col. (1990), se transformaron mediante choque térmico con plásmidos completos o con fragmentos de DNA ligados *in vitro* (Sambrook y col., 1989). Los plásmidos purificados a partir de células de *E. coli* se introdujeron en las células de *A. tumefaciens* por electroporación, siguiendo el protocolo descrito en el manual de instrucciones del aparato “Electro cell manipulator 600” de BTX. En todos los casos los clones deseados se identificaron por análisis de restricción y, eventualmente secuenciación (Macrogen) del DNA plasmídico.

Para conservar las cepas originales y las cepas transformadas de *E. coli* y de *A. tumefaciens* durante periodos cortos de tiempo, se mantuvieron a 4 °C en placas con medio LB solidificado, conteniendo los antibióticos correspondientes. La conservación por largos periodos de tiempo se realizó resuspendiendo las células en medio LB con glicerol al 20% y manteniéndolas a -80 °C.

III.1.2.2. Clones de cDNA del genoma completo del PPV

En este trabajo se emplearon clones cDNA capaces de iniciar la infección del PPV en plantas herbáceas (pICPPV-NK-IgFP y sus derivados) y en plántulas de *P. persica* (pICPPV-5'BDGFP y sus derivados). pICPPV-NK-IgFP proviene del clon cDNA completo del genoma de PPV-R pICPPV-NK (Fernández-Fernández y col., 2001) con el gen de la GFP de pTXS.GFP (Baulcombe y col., 1995) insertado entre sus sitios *NaeI* y *KpnI* (resultados no publicados de P. Sáenz, M.R. Fernández-Fernández y J.A. García). pICPPV-5'BDGFP es un clon quimérico derivado de pICPPV-NK-GFP (Fernández-Fernández y col., 2001) y de cDNA de un aislado del PPV de la raza D que infecta muy eficientemente plantas de *Prunus* (Salvador y col., 2008a). pBIN-PPV-NK-GFP tiene clonada la secuencia de PPV-NK-GFP en pBIN19 para utilizarse en infección mediante agroinfiltración.

III.2. MANIPULACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

III.2.1. Inoculación del PPV

III.2.1.1. Inoculación biolística

Para la inoculación con cDNA viral, el DNA plasmídico se adsorbió sobre partículas de oro que se proyectaron contra el tejido foliar usando el aparato “Helios-Gene Gun” de Bio-Rad de acuerdo al protocolo descrito por López-Moya y García (2000). Para la preparación de los cartuchos se utilizó una suspensión de 2 µg de DNA/mg de oro. En el caso de *Nicotiana* y de *Arabidopsis* se disparó un cartucho por planta, mientras que para la inoculación de plantas de *Prunus* se dispararon 2 cartuchos. Cada cartucho se disparó dos veces, realizando cada disparo en una hoja diferente.

III.2.1.2. Inoculación manual

Para las inoculaciones con extractos de plantas infectadas, se homogeneizó tejido de hojas infectadas congelado en nitrógeno líquido y pulverizado en mortero, en tampón fosfato sódico 5 mM, pH 7.2 (2 ml de tampón por 1 g de tejido). Los restos de tejido se eliminaron por centrifugación. Se emplearon 15 µl de extracto para inocular tres hojas de cada planta de *Nicotiana*, espolvoreadas previamente con carborundo.

III.2.1.3. Inoculación mediante agroinfiltración

Para llevar a cabo la agroinfiltración se cultivaron células de *A. tumefaciens*, transformadas con el plásmido de interés, a 28 °C durante 48 horas en 5 ml de medio LB con rifampicina (25 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml). Doscientos µl de ese cultivo se usaron para inocular 50 ml de medio LB con los mismos antibióticos. El nuevo cultivo se incubó a 28 °C durante 16 horas. Pasado este tiempo se separaron 5 ml del mismo para purificar el plásmido y comprobar su integridad. El resto se centrifugó a 1000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sedimento se resuspendió en una solución de sulfato de magnesio 10 mM, MES 10 mM y acetosiringona 150 µM, en el volumen necesario para que la densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) fuera 0.5. La suspensión de células se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente, y se infiltró el cultivo en los espacios intercelulares de tres (en el caso de *N. benthamiana*) o cinco (para *A. thaliana*) hojas del huésped presionando con una jeringa de 1 ml sobre el envés de cada hoja.

III.2.2. Purificación de viriones del PPV

Para la purificación de viriones del PPV se partió de hojas jóvenes de plantas infectadas de *N. clevelandii*, *N. benthamiana* o *A. thaliana*, y se utilizó el método descrito por Laín y col., (1989) con ligeras modificaciones (Chen y col., 2005). Los viriones purificados se resuspendieron en borato de sodio 50 mM, pH 8.2, y se conservaron a -20 °C, hasta su uso.

III.2.3. Manipulación de plantas en cultivos *in vitro*

III.2.3.1. Transformación y desarrollo de plantas a partir de discos de hoja

El procedimiento de transformación genética por incubación de discos de hojas con cultivos de *A. tumefaciens* está basado en el descrito por Horsch y col. (1985) con algunas modificaciones. Se seleccionaron hojas sanas, sin daños, de plantas jóvenes de *N. benthamiana*, cultivadas en invernadero, y se esterilizaron con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 1%. Se cortaron en cuadrados pequeños para producir heridas en los bordes y se cultivaron durante dos días en medio MS con 1 µg/ml de BAP, 0.1 µg/ml de NAA y 1% de sacarosa (medio de regeneración). Para la posterior inoculación se seleccionaron los explantes que mostraban protuberancias. Las células de *A. tumefaciens*, que portaban el plásmido adecuado para cada transformación, se cultivaron en medio YEP sin extracto de levadura y con 5 mg/ml de tetraciclina. Las bacterias se recolectaron por centrifugación y se resuspendieron en medio MS con 150 µM de acetosiringona. Los explantes seleccionados se inocularon por inmersión en la suspensión de *A. tumefaciens*. Después de secarlos ligeramente, se colocaron en medio de regeneración solidificado y se incubaron a 25 °C durante 2 días en oscuridad. Posteriormente, se transfirieron a medio de regeneración solidificado que contenía 100 µg/ml de kanamicina (medio de selección) y 250 µg/ml de cefotaxima y se incubaron a 25° C bajo un fotoperiodo de 14 h de luz intensa y 10 h de oscuridad.

Los brotes aparecieron al cabo de 3-4 semanas. Una vez alcanzado un tamaño aproximado de 0.5 cm, se cortaron y transfirieron individualmente a medio MS con 1% de sacarosa y 100 µg/ml de kanamicina (medio de enraizamiento). A medida que fueron enraizando las plántulas, se trasplantaron a macetas pequeñas con tierra estéril y se mantuvieron durante una semana en un fitotrón con 70% de humedad y 22 °C de temperatura.

Tras este período de aclimatación, las plantas se transfirieron al invernadero hasta la producción de semillas por autofecundación.

III.2.3.2. Análisis de segregación de líneas tras reproducción sexual

Se recogieron las semillas de las plantas transformadas de *N. benthamiana* (generación F0). Se pusieron a germinar treinta de estas semillas transgénicas en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con 1% de sacarosa y 100 mg/l de kanamicina para realizar la selección mediante resistencia al antibiótico. Tras dos semanas se cuantificó su segregación contabilizando el número de plántulas que crecían con normalidad frente al total de semillas germinadas. Se cultivaron plantas (generación F1) de las líneas que mostraban una segregación de la resistencia a kanamicina 3:1 y se pasaron al invernadero, hasta obtener semillas por autofecundación. El proceso se repitió para obtener plantas de generación F2 homocigotas, con las que se realizaron los distintos experimentos.

III.2.4. Monitorización de la infección viral

La GFP expresada por el PPV se observó por exposición a una lámpara de luz UV (Black Ray model B 100 AP) y se tomaron fotografías con una cámara digital Nikon D1X. También se realizaron observaciones con un microscopio de fluorescencia Leica MZ FLIII con filtros de excitación y de barrera de 480/40 nm y 510 nm, respectivamente, y se tomaron fotografías con una cámara digital Olympus DP70.

III.3. PREPARACIÓN Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

III.3.1. Purificación de ácidos nucleicos

III.3.1.1. Obtención de DNA plasmídico

La purificación de DNA plasmídico a partir de cultivos de colonias de *E. coli* se realizó por el método de lisis alcalina descrito por Sambrook y col. (1989). Las preparaciones de plásmidos en pequeña escala se hicieron a partir de 5 ml de cultivo bacteriano y las de mayor escala a partir de 150 ml. Para la obtención del DNA plasmídico a partir de cultivos de colonias de *A. tumefaciens* se usó el estuche “QIAprep Spin Miniprep kit”, siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen).

III.3.1.2. Obtención de DNA genómico de plantas

La purificación de DNA genómico de plantas de *A. thaliana* y de *N. benthamiana* se realizó con los estuches GenElute Plant Genomic DNA (SIGMA) y DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) respectivamente, a partir de 250 mg de tejido previamente congelado y pulverizado en nitrógeno líquido.

II.3.1.3. Obtención de RNA total de plantas

La purificación de RNA total de plantas de *A. thaliana* y *N. benthamiana* se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Logemann y col. (1987), utilizando el tampón-Z6, a partir de 50 mg de tejido previamente congelado y pulverizado en nitrógeno líquido.

III.3.2. Tratamientos enzimáticos en los procesos de clonación

Las enzimas de restricción se emplearon según las especificaciones de cada proveedor (NEB o Fermentas). La eliminación de los grupos fosfato de los extremos 5' de fragmentos de DNA obtenidos por digestión enzimática se realizó mediante tratamiento con fosfatasa alcalina de gamba siguiendo las instrucciones del proveedor (USB). La ligación de fragmentos de DNA se efectuó con ligasa de DNA del bacteriófago T4 (Fermentas). Todos los tratamientos descritos con enzimas modificadoras en los que no se ha especificado el protocolo, se realizaron según lo descrito por Sambrook y col. (1989).

III.3.3. Amplificación de DNA mediante PCR

Las amplificaciones de DNA mediante la reacción de polimerización en cadena (PCR) (Saiki y col., 1985) se realizaron en un termociclador PTC-100TM (MJ Research, INC). Para amplificar los fragmentos de DNA utilizados en los procesos de clonación se usó el sistema Expand High Fidelity (Roche) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. La introducción de las mutaciones individuales en la secuencia codificante de la CP del PPV se llevó a cabo incluyendo en los iniciadores las modificaciones de secuencia apropiadas. Como iniciadores de la elongación se emplearon diferentes oligonucleótidos sintéticos (5 ng/μl por reacción). El número de ciclos y las condiciones de cada uno de ellos se ajustaron según la pareja de iniciadores empleados.

III.3.4. Amplificación de RNA viral mediante inmunocaptura y RT-PCR (IC-RT-PCR)

La amplificación de RNA viral por PCR precedida de inmunocaptura (IC) y transcripción reversa (RT) se realizó con muestras procedentes de extractos de plantas infectadas o de virus purificado. El material vegetal infectado se homogeneizó en tampón fosfato de sodio 5 mM pH 7.2. Las muestras así preparadas (50 µl) se incubaron a 4 °C toda la noche y durante 2 h a temperatura ambiente en tubos previamente tapizados con IgGs anti-CP del PPV. A continuación, tras tres lavados con tampón PBS-Tween, se llevaron a cabo conjuntamente las reacciones de RT y PCR utilizando el estuche “Titan PCR System” (Roche).

Para verificar la estabilidad de las mutaciones se amplificó la región codificante de la GFP y del extremo N-terminal de la CP del PPV. La pareja de oligonucleótidos empleada como iniciadores fue la 80-55 (ver apartado III.4). Para la amplificación de las muestras provenientes de los experimentos de co-inoculación se utilizó el par de oligonucleótidos ETGFP-1 forward y 55. Los fragmentos de DNA obtenidos mediante IC-RT-PCR se purificaron con el estuche “miniELUTE PCR purification kit” (Qiagen).

III.3.5. Electroforesis en geles de agarosa. Extracción y purificación de los fragmentos de DNA separados por electroforesis

La separación de fragmentos de DNA se realizó mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa, a una concentración del 1.0 %, y con 10 mg/ml de BrEt. Como electrolito se utilizó tampón TBE (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM pH 8). Los geles se fotografiaron con un captador de imágenes “Gel Doc 2000” (Bio-Rad) con transiluminador de radiación UV.

Los fragmentos de DNA del tamaño deseado se purificaron por el método de “Freeze and Squeeze” (Tautz y Renz, 1983) o con el estuche “QIAEX II Gel extraction kit” (Qiagen).

III.3.6. Secuenciación de DNA

Las primeras secuenciaciones de este trabajo se realizaron con un secuenciador automático ABI Prism 3700 en un servicio interno del Centro Nacional de Biotecnología. Posteriormente, las secuenciaciones se realizaron en las compañías Secugen o Macrogen.

III.3.7. Marcaje de RNA para la realización de sondas radioactivas

La sonda radiactiva marcada con α -³²P CTP (300 Ci/mmol) que se usó para determinar la acumulación de mRNA de SEC se obtuvo sintetizando por transcripción *in vitro* un fragmento de RNA complementario a la región 3' del mRNA de SEC-b2. La transcripción *in vitro* se realizó con el estuche “MAXIscriptT7” (Ambion Inc), sustituyendo la RNA polimerasa del fago T7 por la del fago SP6 (Roche). Como molde se usó el plásmido pTOPO-TA-SEC-b2 (ver apartado III.5.3) digerido con la enzima *EcoRV*.

Para purificar el RNA marcado radiactivamente y eliminar la radiactividad no incorporada se utilizaron columnas “Illustra MicroSpin S-200 HR” (GE-Healthcare) siguiendo el protocolo del fabricante.

III.3.8. Detección de secuencias de RNA por hibridación con sondas radioactivas

Para el análisis tipo Northern, se desnaturalizaron muestras de 10 µg de RNA por calentamiento a 55 °C durante 15 minutos en presencia de MOPS 40 mM, formaldehído 6% y formamida 50%, pH 7. A continuación se separaron en geles de agarosa 1% en el mismo tampón, y se transfirieron por capilaridad a una membrana de Nylon Zeta-Probe (Bio-Rad) con solución tampón SSC 6x, durante 16 horas. La fijación del RNA a la membrana se realizó por radiación-UV (1500 julios) en un aparato Ultraviolet Crosslinker (Amersham). El RNA fijado a la membrana se tiñó con azul de metileno (como control de carga) y posteriormente se pre-hibridó durante una hora a 65 °C en el tampón ULTRAhybTM (Ambion). En este mismo tampón se llevó a cabo la hibridación con la sonda marcada a 65 °C durante toda la noche. La membrana se lavó dos veces a 45 °C durante 5 minutos con 2xSSC y SDS 0.1%, y otras dos veces a la misma temperatura durante 15 minutos en 0.1xSSC y SDS 0.1%. Películas sensibles a la radiación se expusieron sobre la membrana en oscuridad y posteriormente fueron reveladas.

III.4. OLIGONUCLEÓTIDOS

III.4.1. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de los mutantes de cada ecotipo de *Arabidopsis*

Para identificar plantas mutantes *sec-1* de *Arabidopsis*

Oligo-Feldman left 5'- GATGCAATCGATATCAGCCAATTTTAGAC -3'

Oligo-NSIR 5'-TGGGTCAATACGAAGAACCTCATTATAG -3'

Para identificar plantas mutantes *sec-2* de *Arabidopsis*

Oligo-Jack left 5'- GAACATCGGTCTCAATGCA -3'

Oligo-NS4R 5'- AAACCAAGACAAAATCCAGATCCTCATCA -3'

Para identificar plantas mutantes *spy-3* de *Arabidopsis*

Oligo-Spy-LPD 5'- AAAACAGTCCGGAGCCTAACC -3'

Oligo-JP91 5'- GCGACCTATCACCATTGGA -3'

III.4.2. Oligonucleótidos utilizados para la obtención de los diferentes mutantes puntuales y múltiples de la CP del PPV

Para cambiar por alanina las diferentes treoninas o serinas que se mutaron en la secuencia de la CP del PPV se utilizaron los siguientes oligonucleótidos mutadores:

Oligo-T19A 5'- CGGTGCAGCAACTACAC -3'

Oligo-T24A 5'- TGGGCTAGCTGCTGCCG -3'

Oligo-S25A 5'- GTATTGGGGCAGTTGCTGC -3'

Oligo-T50A 5'- GCTGGCGCGAAAATGGG -3'

Oligo-T53A 5'- GAGTTGCTGCTGGCGTG -3'

Oligo-T54A 5'- TTGAGCTGTTGCTGGCGT -3'

Oligo-T58A 5'- GTTTTGCTGCTGGTTGAG -3'

Oligo-T71A 5'- CAAAAGCTTGCAGTTGAGG -3'

Oligo-T74A 5'- CCATATGCTCCAAAAGTTTG -3'

Oligo-T91A 5'- TGTTTGCGTTGACTAGCG -3'

Para la creación del mutante TT19,24AA, se utilizó el oligo mutador T19A, y como molde de amplificación el clon mutante pICPPV-NK-lGFP-T24A.

Otros oligonucleótidos utilizados en los procesos de clonación de las secuencias con mutaciones puntuales, en la transferencia de las mutaciones múltiples MG, MG-T40, MG-T41 y MG-S43 (Scott y col., 2006), y en la secuenciación de la secuencia codificante de la zona mutada de la CP del PPV:

Oligo-80 5'- TTGGGTTCTTGAACAAGC -3'

Oligo-55 5'- CTATGCACCAAACC -3'

Oligo-ETGFP-1 sentido 5'- GTGCACCAAGCTGACGAAAGAGAAGAC -3'

Oligo-ETGFP-2 antisentido 5'- CACCTGTGAAACTGGTTTTGTTGC -3'
Oligo-272 5'- TTTAACGATGATGGTG -3'

III.4.3. Oligonucleótidos utilizados en la construcción y análisis de los plásmidos con las IR de SEC

Oligonucleótidos degenerados utilizados en los procesos de amplificación de la IR de los genes de SEC a partir de RNA total purificado de tejido de *N. benthamiana*:

Oligo-P1-1 5'- ATACARATMYTWATCAAYC -3'
Oligo-P1-2 5'- AATGGYTAYACHAAGGGKGC -3'
Oligo-P2-1 5'- ACGYTTRAGRATRITTCACC -3'
Oligo-P2-2 5'- RAGWGCACGTGTTKGGHAC -3'

Donde R=A,G; M=A,C; Y=C,T; W=A,T; K=T,G; H=A,T,C.

El siguiente oligo se utilizó para introducir en el fragmento amplificado de la IR de los genes de SEC, las dianas *XbaI* y *ClaI*:

Oligo-P1 5'- TCTAGAATCGATAATGGTTATCACAGCAAGGGGTGC -3'

Oligonucleótidos utilizados para identificar la IR de las plantas transgénicas:

Oligo-P776 5'- GTAAGTAGATCTTCAACA -3'
Oligo-P777 5'- CTGCAAACACACAAGAC -3'
Oligo-SEC P2-1 5'- ACGYTTRAGRATRITTCACC -3'

Donde Y=C+T y R=A+G

Oligonucleótidos utilizados en la amplificación del fragmento 3'-terminal de las secuencias de los genes de SEC para utilizarse como sonda radiactiva para detectar el nivel de expresión de SEC:

Oligo-1a 5'- CTGAGATTTTTATAACTTGG -3'
Oligo-2b 5'- ATAAGTTGGTGCAACATCC -3'

III.5. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS

III.5.1. Obtención de plásmidos con mutaciones puntuales en la secuencia codificante de la CP del PPV

Las mutaciones de los codones de los residuos de Ser y/o Thr presuntamente glicosilables de la CP del PPV, se realizaron usando el método de PCR en 2 pasos (Herlitze y

Koenen, 1990). En la primera reacción de PCR (PCR-1) se usaron como iniciadores los oligonucleótidos mutadores (apartado III.4) y como molde pICPPV-NK. Los productos de la PCR-1 y un fragmento específico del plásmido pICPPV-NK digerido con las enzimas *BsaBI*-*EcoRV*, se utilizaron en una segunda reacción de PCR (PCR-2) con los oligonucleótidos flanqueantes 80 y 55 (apartado III.4). Con los productos de la PCR-2 digeridos con *KpnI* y *SacI* se reemplazaron los fragmentos correspondientes en pICPPV-NK-IGFP. Posteriormente, algunas de las mutaciones se transfirieron al clon pICPPV-5'BDGFP usando también las enzimas *KpnI*-*SacI*.

Las secuencias codificantes de los mutantes múltiples de la CP del PPV MG (S16A, T19A, T24A, S25A, T40A, T41A, S43A), MG-T40 (S16A, T19A, T24A, S25A, T41A y S43A), MG-T41 (S16A, T19A, T24A, S25A, T40A y S43A), y MG-S43 (S16A, T19A, T24A, S25A, T40A y T41A), se obtuvieron a partir de los plásmidos pp4-2 MG, pp4-2 MG-T40, pp4-2 MG-T41 y pp4-2 MG-S43, proporcionados por el laboratorio del Dr. Neil Olszewski (Universidad de Minnesota) (Scott y col., 2006). La amplificación de estas secuencias se realizó mediante PCR con los oligonucleótidos ETGFP-1 sentido y ETGFP-2 antisentido (apartado III.4). El producto de esta primera PCR y un fragmento obtenido cortando de pICPPV-NK-IGFP con las enzimas *EcoRV* y *BpiI* se utilizaron como molde para una segunda PCR con los oligonucleótidos 272 y ETGFP-2 antisentido (apartado III.4). El producto de la nueva PCR y un fragmento obtenido cortando de pICPPV-NK-IGFP con las enzimas *BpiI* y *Bsh1365I* se usaron como molde para una tercera PCR con los oligonucleótidos 272 y 55 (apartado III.4). El producto de esta última amplificación se digirió con las enzimas *KpnI* y *SacI* para reemplazar los fragmentos correspondientes en pICPPV-NK-IGFP y pICPPV-5'BDGFP.

La mutagénesis para crear el mutante múltiple CP7T/A, en el que las treoninas T19, T24, T41, T50, T53, T54 y T58 de la CP del PPV han sido reemplazadas por alaninas, se realizó por síntesis química (Genscript Corporation Piscataway, NJ, USA) del fragmento de cDNA correspondiente a la región del genoma del PPV comprendida entre los nt 9482 y 9953, a la que se le añadió en sus extremos las dianas de restricción *KpnI* y *SacI*, y se clonó en el plásmido pUC57. Con el fragmento *KpnI*-*SacI* del plásmido resultante se reemplazó el fragmento correspondiente de pICPPV-NK-IGFP y pICPPV-5'BDGFP.

En todos los casos se verificó la precisión de la clonación y la presencia de la(s) mutación(es) esperada(s) mediante análisis de restricción y secuenciación del fragmento clonado.

III.5.2. Construcción de plásmidos con repeticiones invertidas (IR) de fragmentos de los genes *SEC-b2* y *SEC-b3*

En el plásmido pCAMBIA1300 se realizaron las dos construcciones que contenían las repeticiones invertidas de los genes de SEC que se utilizaron para transformar plantas de *N. benthamiana*.

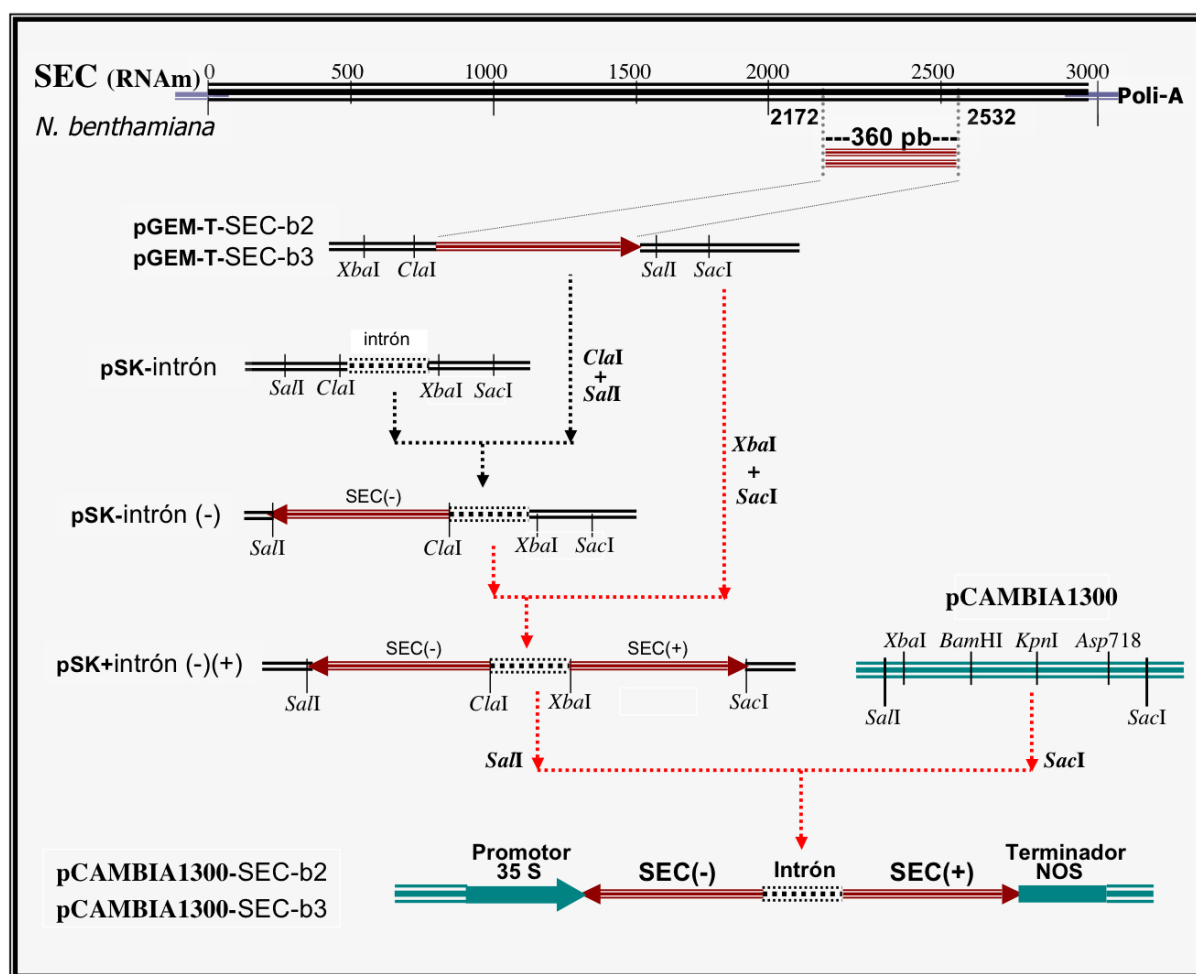


Figura III.1. Representación esquemática de la construcción de plásmidos con IR de los genes de SEC. En la parte superior se muestra en negro el mRNA de los genes de SEC. En rojo se indica la zona altamente conservada de SEC que se utilizó para construir las repeticiones invertidas. Debajo se esquematiza la clonación de este fragmento, primero en pGEM-T, y después, como IR en pSK-intrón (el intrón está indicado con línea discontinua). Más abajo se indica la estrategia utilizada para transferir las IR de *SEC-b2* y *SEC-b3* desde pSK al vector de expresión en plantas pCAMBIA1300 (en azul).

A partir de RNA total purificado de *N. benthamiana* se amplificó utilizando oligonucleótidos degenerados (apartado III.4) un fragmento altamente conservado de los genes de SEC. Los fragmentos correspondientes a *SEC-b2* y *SEC-b3* se clonaron mediante el

sistema pGEM-T (Promega), se reamplificaron con iniciadores que introducen en uno de sus extremos los sitios de restricción *Xba*I y *Cla*I y se volvieron a clonar con el mismo sistema. Los fragmentos *Cla*I-*Sall* y *Xba*I-*Sac*I con las secuencias SEC de los plásmidos resultantes se clonaron en sentido y antisentido en cada uno de los flancos del intrón del vector pSK-intrón (Fig. III.1). A partir de los vectores intermediarios resultantes, pSK+intrón(-)(+)SEC-b2 y pSK+intrón(-)(+)SEC-b3, se obtuvo por digestión con *Sall* y *Sac*I el fragmento con la IR de SEC completa correspondiente, para su clonaje en el vector de expresión en plantas pCAMBIA1300 (Fig. III.1). Este vector contiene el promotor 35S del *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) potenciado y el terminador de la nopalina sintetasa (NOS).

III.5.3. Construcción de un plásmido para ser utilizado en la obtención de una sonda radiactiva para detectar el nivel de expresión de SEC

A partir de RNA total purificado de *N. benthamiana* se amplificó por RT-PCR un fragmento de DNA de la región 3'-terminal de *SEC-b2*, con los iniciadores oligo-1a y oligo-dT (apartado III.4). Sobre el producto de esta primera reacción se realizó una PCR semianidada con los oligonucleótidos oligo-2a y oligo-dT (apartado III.4). El fragmento resultante, de 641 pb se clonó mediante el sistema TOPO-TA clonning (Invitrogen), dando lugar al plásmido pTOPO-TA-SEC-b2.

III.6. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

III.6.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida y análisis de western

Tejido pulverizado en nitrógeno líquido se homogeneizó en tampón fosfato 5 mM pH 7.2 (2 ml de tampón por 1 g de hojas). Después de eliminar restos celulares por centrifugación, el sobrenadante se mezcló con un volumen de tampón de disociación (Tris-HCl 125 mM pH 7.5, SDS 2%, azul de bromofenol 0.1%, urea 6M, β -mercaptoetanol 5%). En algunos casos, el tejido se homogeneizó directamente en tampón de disociación. Las muestras se calentaron a 96 °C durante 5 min y los restos celulares aún remanentes se eliminaron por centrifugación. Las proteínas de los extractos se separaron por electroforesis en geles de 12.5% de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se tiñeron en una solución de rojo Ponceau (como control de carga). A continuación, se analizaron por inmunorreacción con suero anti CP del PPV. Como

reactivo secundario se usó un anticuerpo contra IgGs de conejo marcado con peroxidasa. El revelado se realizó por la reacción de la peroxidasa con sustratos quimioluminiscentes usando el estuche LiteAblot (Euroclone).

III.7. ANALISIS DE LA CP DEL PPV POR ESPECTROSCOPIA DE MASAS

III.7.1. Análisis por MALDI-TOF de la CP del PPV

Aproximadamente 10 µg de viriones purificados del PPV se digirieron con 2 ng de tripsina porcina modificada (Promega) en 10 µl de bicarbonato amónico 25 mM pH 8. La digestión se llevó a cabo a 37 °C durante 20 min, y se detuvo añadiendo 1 µl de ácido trifluoroacético 0.5%. La sal de los productos de la reacción se eliminó con una columna de fase reversa C₁₈ Zip-Tip (Millipore), de la que se eluyó la muestra en 5 µl de acetonitrilo 70% y ácido trifluoroacético 0.1%.

Unos 0,4 µl de la solución matriz (ácido 2,5-dihidroxibenzóico 5 g/l en acetonitrilo 33%, ácido trifluoroacético 0,1%) se depositó en una placa AnchorChip MALDI de 400 µm (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) y se secó a temperatura ambiente. Después, se añadió 0,4 µl de la mezcla de péptidos tripticos, que también se secaron a temperatura ambiente. La detección de las huellas peptídicas se realizó con un espectrómetro de masas MALDI-TOF Bruker Reflex IV (Bruker Daltonics) equipado con un láser de nitrógeno de 337 nm. Los análisis se llevaron a cabo en modo reflector de iones positivos, acumulando 120 disparos, con 400 ns de extracción de pulso de iones retrasados y un voltaje de aceleración de 20 kV y 1600 V en el detector reflector. El espectro de masas se calibró externamente utilizando una mezcla de péptidos estándar (angiotensina II, sustancia P, bombesina, somatostatina 28 y citocromo C).

El procesamiento de espectros y el análisis de los datos se llevaron a cabo con los programas informáticos XTOF 5.1.1, FlexAnalysis 2.4 y Biotools 2.1 de Bruker Daltonics.

II.7.2. Análisis por LC-MS/MS de la CP del PPV

Los viriones purificados del PPV se redujeron y alquilaron según el protocolo descrito por Udeshi y col. (2008) y se digirieron con endoproteasa LysC (Roche) y/o tripsina (Promega) en una proporción 1:20 de enzima/sustrato. Los péptidos se resuspendieron en ácido acético 0.1% y se cargaron en una precolumna microcapilar de 360 µm o.d. x 75 µm i.d.

C18 (5-20 μm de diámetro, 120 \AA). A la muestra se le eliminó la sal lavando la columna con ácido acético 0.1%. Después del lavado, la precolumna se conectó a una columna analítica de 360 μm o.d. x 50 μm i.d. C18 (5 μm de diámetro, 120 \AA) equipada con un emisor de electrospray integrado (Martin y col., 2000). Los péptidos se eluyeron en un espectrómetro de masas a un flujo de 60 nl/min utilizando un gradiente de HPLC de solvente B 0-60% en 60 min (A= ácido acético 0.1M, B= acetonitrilo 70%, ácido acético 0.1M). Para obtener el espectro ETD MS/MS se utilizó un espectrómetro de masas LTQ-XL utilizando los siguientes parámetros: tiempo de reacción=150 milisegundos, AGC completo=1E4 cuentas de iones, AGC MSn=1E4 cuentas de iones, ventana de aislamiento=3 m/z, reactivo AGC=3E5 cuentas de iones, reactivo ETD=fluoranteno. Todas las secuencias de los péptidos de la CP del PPV se confirmaron mediante interpretación manual de los espectros ETD MS/MS correspondientes.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.1. IDENTIFICACIÓN DE SECRET AGENT (SEC) COMO LA *O*-GlcNAc TRANSFERASA (OGT) QUE GLICOSILA A LA CP DEL PPV

IV.1.1. La región N-terminal de la CP del PPV está *O*-GlcNAcilada tanto en plantas de *A. thaliana* como en plantas de *N. benthamiana*

La primera detección de modificaciones por *O*-GlcNAc en la región N-terminal de la CP del PPV (Fig. IV.1) fue en viriones purificados de plantas infectadas de *N. clevelandii* (Fernández-Fernández y col., 2002a). Con el fin de determinar si esta modificación también tenía lugar en otras especies de plantas, se purificaron viriones a partir de plantas de *N. benthamiana* y de los ecotipos de *A. thaliana* Col-0 y WS infectadas con el PPV. Estos viriones se digirieron parcialmente con tripsina y los péptidos obtenidos se analizaron por espectroscopía de masas, todo de acuerdo a lo realizado por Fernández-Fernández y col. (2002a).

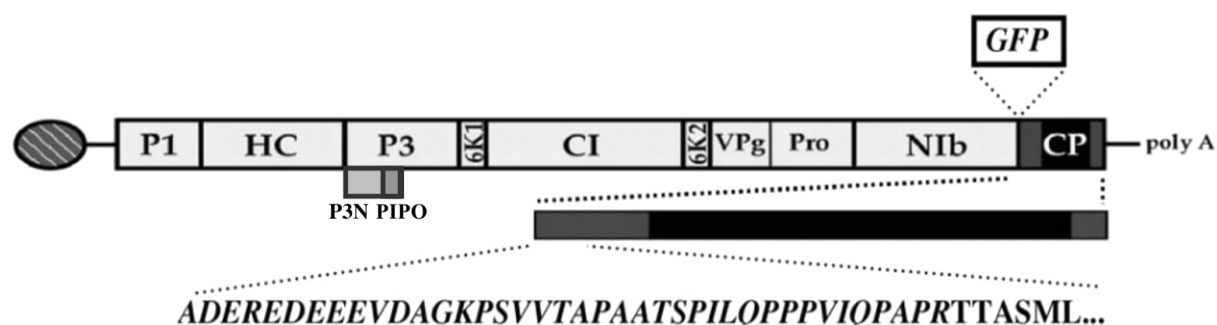


Figura IV.1. Localización de la secuencia codificante de la CP en el genoma de PPV-NK-GFP, y secuencia aminoacídica de su extremo N-terminal. En el interior de la caja que representa a la poliproteína viral se muestran los productos proteicos que genera su procesamiento proteolítico. La CP se divide en tres regiones marcadas en gris (N-terminal y C-terminal) y negro (central). En la parte superior se muestra el gen de la GFP, usado como reportero. La secuencia del péptido triptico que va desde el aminoácido 1 al 39 está subrayada.

Los espectros de MALDI-TOF de la CP de los viriones de las tres plantas fueron muy similares (Fig. IV.2). Como en el análisis de los viriones purificados de *N. clevelandii* (Fernández-Fernández y col., 2002a), se detectaron tres picos mayoritarios. El primero corresponde al tamaño del péptido que va desde el residuo 1 al 39 (Fig. IV.1) no modificado

($m/z = 4,077$ Da). Los otros dos picos corresponden a formas modificadas de este péptido con las diferencia de masa de 203 y 406 Da esperables de la presencia de uno o dos residuos de *O*-GlcNAc. Este resultado indica que la *O*-GlcNAcilación de la CP del PPV se produce de manera similar en diferentes huéspedes herbáceos.

IV.1.2. La infección del PPV se ve alterada en *A. thaliana* por mutaciones *sec*

A. thaliana contiene dos proteínas con estructura y función similar a las OGTs, SECRET AGENT (SEC) y SPINDLY (SPY). Mientras SEC es más similar a las OGTs de animales, SPY presenta más similitud con las OGTs de algas (Hartweck y col., 2002; Jacobsen y col., 1996; Olszewski y col., 2010; Thornton y col., 1999). Se han descrito dos mutantes de inserción de T-DNA en el gen *SEC*, uno, *sec-1*, se encuentra en el fondo del ecotipo WS, y el otro, *sec-2*, en el del ecotipo Col-0. El mutante *sec-1* tiene el T-DNA insertado en el dominio de repeticiones de tetratricopéptidos. La inserción del T-DNA en *sec-2* está en un intrón adyacente a los exones que codifican a la región catalítica de la proteína (Hartweck y col., 2002). Por otro lado *spy-3* está en el fondo genético de Col-0 y tiene una sustitución de una serina por una glicina en la región C-terminal de la proteína (Jacobsen y col., 1996). Los mutantes *sec-1* y *sec-2* no muestran alteraciones fenotípicas apreciables, sin embargo en las plantas *spy-3* se observan defectos en la respuesta a giberelinas y citoquininas, en la floración, en la regulación de los ritmos circadianos y en la inhibición de la elongación por la luz de los hipocotilos (Greenboim-Wainberg y col., 2005; Jacobsen y Olszewski, 1993; Sothorn y col., 2002; Tseng y col., 2004). Un punto importante es que los dobles mutantes *sec-1/spy-3* y *sec-2/spy-3*, en homocigosis, mueren durante la embriogénesis, lo que indica que SEC y SPY tienen funciones redundantes esenciales (Hartweck y col., 2002).

Para averiguar si SEC o SPY, o ambas OGTs, participan en la adición de residuos de *O*-GlcNAc a la CP del PPV, se inocularon por agroinfiltración plantas *sec-1*, *sec-2*, y *spy-3* con PPV-NK-GFP, un PPV recombinante que expresa GFP, lo que facilita la monitorización visual de la infección. La sintomatología característica de la infección del PPV en plantas de *A. thaliana* consiste en clorosis de las hojas, sobre todo en las nervaduras, recogimiento de la roseta, rizado de las hojas caulinares y acortamiento de los tallos florales. La mayoría de las plantas inoculadas de los tres genotipos mutantes se infectaron, y mostraron síntomas similares a los de las plantas silvestres, sobre todo al final de la infección. Sin embargo, el examen de la fluorescencia de la GFP mostró diferencias en los patrones de infección (Fig. II.2). A 12 días después de la inoculación (dpi), el número de hojas infectadas en las plantas

silvestres y en las plantas *spy-3* fue muy similar. Por el contrario en las plantas *sec-1* o *sec-2* el porcentaje de hojas que mostraban fluorescencia de GFP fue ligeramente más bajo. Además, la difusión de la infección desde las venas principales y la extensión a la lámina foliar se veían reducidas en las plantas con cualquiera de los alelos *sec*, en comparación con las correspondientes plantas silvestres (wt). A los 19 dpi las diferencias en la extensión de la propagación del virus eran mucho menores, observándose niveles de fluorescencia de GFP muy similar en todos los genotipos (Fig. IV.2 y IV.3).

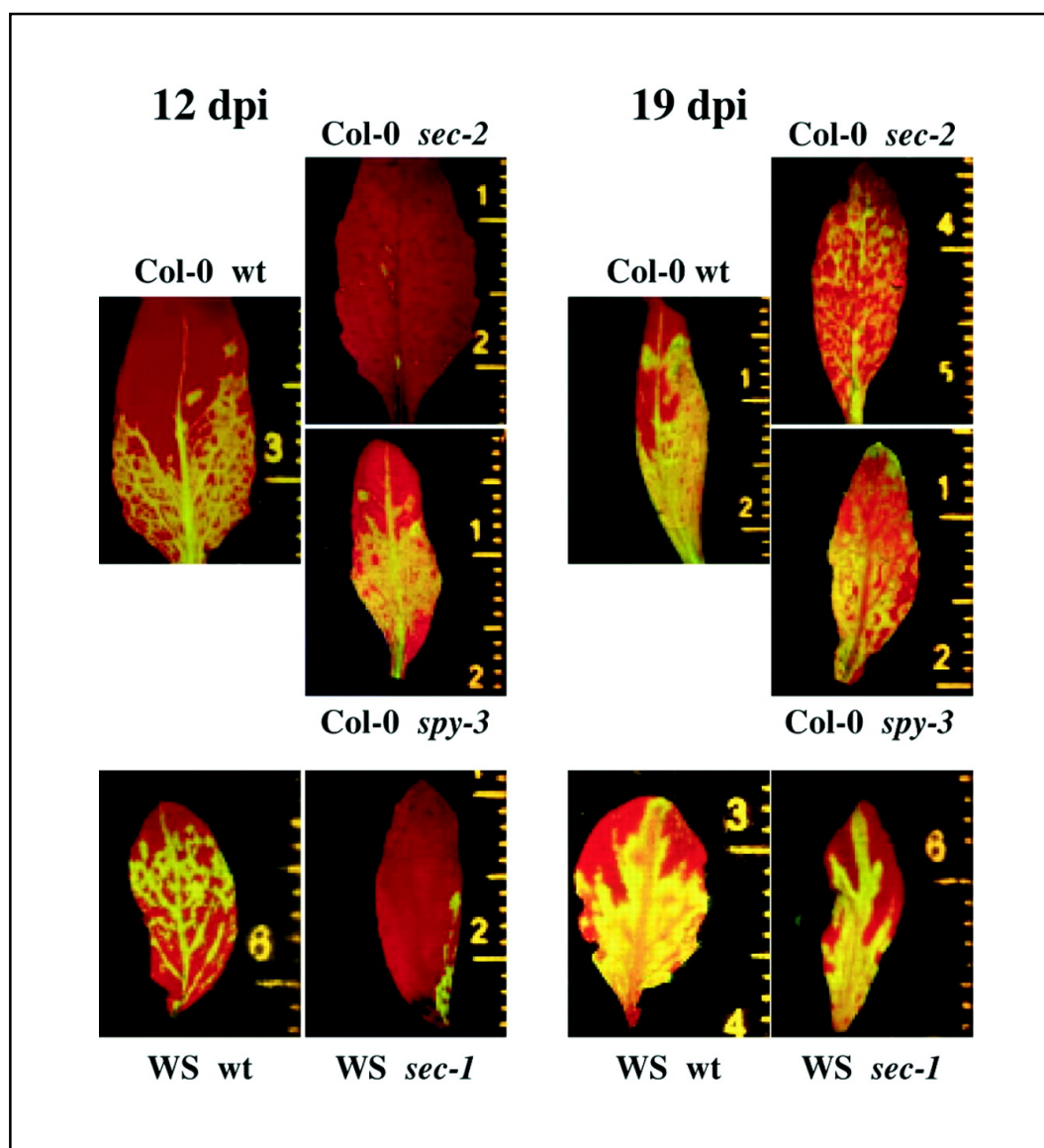


Figura IV.2. **Propagación del PPV en plantas de *Arabidopsis* silvestres y mutantes *sec-* o *spy-*.** Se inocularon las plantas con PPV-NK-GFP y se examinaron con un microscopia de fluorescencia, a los 12 y 19 dpi. Se muestra al lado derecho de cada imagen una regla con las divisiones menores en mm.

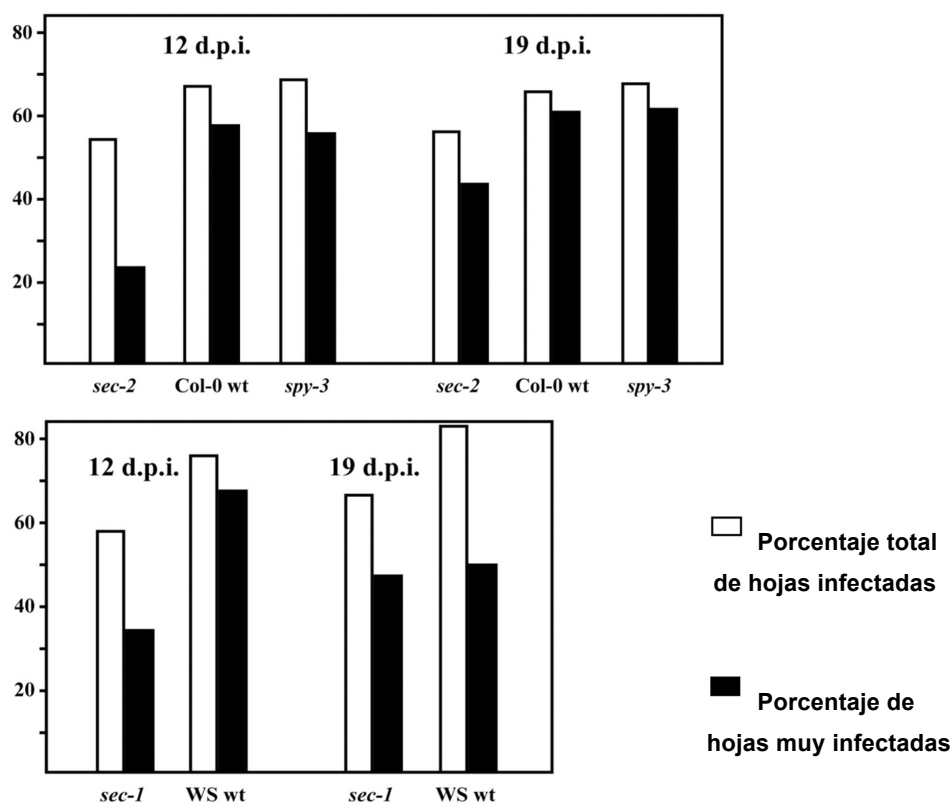


Figura IV.3. Niveles de infección del PPV en plantas de *Arabidopsis* silvestres y mutantes *sec-* o *spy-*. A los 12 y 19 dpi se recolectaron 4-5 plantas infectadas con PPV-NK-GFP y se observaron todas las hojas con un microscopio de fluorescencia. Las hojas se clasificaron como muy infectadas cuando la fluorescencia de GFP ocupaba más de un cuarto de la lámina foliar, o más de la mitad de la vasculatura de la hoja. wt, plantas silvestres de *Arabidopsis*.

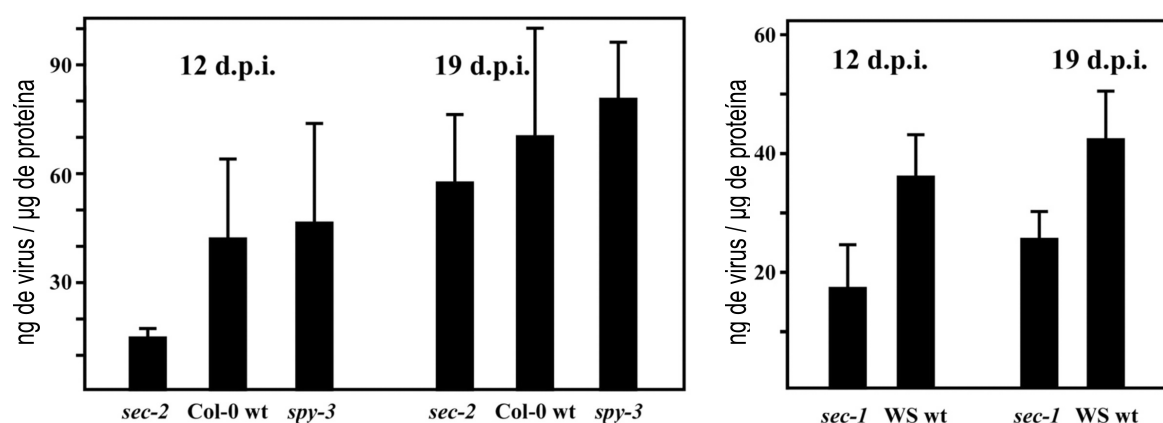


Figura IV.4. Acumulación viral en hojas de plantas de *Arabidopsis* silvestres y mutantes *sec-* y *spy-* infectadas con el PPV. La cantidad de virus se determinó por ELISA. Se analizaron dos grupos de hojas caulinares y dos de hojas de roseta infectadas sistémicamente, de cinco (Col-0 wt, *sec-2*, y *spy-3*) o cuatro (WS wt y *sec-1*) plantas. Las hojas se recolectaron a los 12 dpi (entre 8 y 36 hojas caulinares y entre 15 y 28 hojas de roseta) y a los 19 dpi (entre 15 y 35 hojas caulinares y entre 6 y 21 hojas de roseta). En las gráficas se muestran los valores promedio así como su desviación estándar. Las diferencias, entre Col-0 wt y *sec-2* a 12 dpi y entre WS wt y *sec-1* a 12 y 19 dpi eran estadísticamente significativas (valores *P* de 0.04, 0.01, y 0.01). Las diferencias entre Col-0 wt y *sec-2* a 19 dpi y entre Col-0 wt y *spy-3* a 12 y 19 dpi no eran estadísticamente significativas (valores *P* de 0.5, 0.82, y 0.53). wt, plantas silvestres de *Arabidopsis*.

Para estimar de una manera más cuantitativa el progreso de la infección del PPV en los diferentes genotipos, se evaluó por medio de ELISA la cantidad de virus acumulado en las hojas infectadas. A los 12 dpi la acumulación viral era significativamente menor en las plantas *sec-1* y *sec-2* que en las correspondientes plantas silvestres (Fig. IV.4). Por el contrario, el título viral no se veía afectado por la mutación *spy-3*. De acuerdo con los resultados de la observación de la fluorescencia de la GFP, las diferencias de acumulación viral fueron mucho menos acusadas a 19 dpi (Fig. IV.4).

IV.1.3. La *O*-GlcNAcilación de la región N-terminal de la CP del PPV se pierde por mutaciones *sec*⁻, pero no se ve afectada por una mutación *spy*⁻

Se purificaron viriones del PPV de plantas infectadas *sec-1*, *sec-2*, y *spy-3*, se digirieron parcialmente con tripsina y los péptidos obtenidos se analizaron por MALDI-TOF. El espectro de los viriones procedentes de las plantas *spy-3* mostró la presencia del péptido 1-39 en sus formas, no glicosilada, mono- y di-glicosilada (Fig. IV.5D), tal como los de los viriones purificados de plantas silvestres de *Arabidopsis* y de *N. benthamiana* (Fig. IV.5A-C). Por el contrario, en el caso de las muestras de viriones de plantas *sec-1* y *sec-2* solo se detectó el péptido 1-39 en su forma no glicosilada (Fig. IV.5E y F), lo que indica que SEC es necesaria para la *O*-GlcNAcilación de la CP del PPV y que SPY, en ausencia de SEC, no es capaz de realizar esta modificación postraduccional.

Previamente, se había reportado la existencia de formas acetiladas del péptido 1-39 (con un incremento de masa de 42 Daltones) de la CP del PPV propagado en *N. clevelandii*, tanto en su forma no glicosilada como en las variantes mono- y di-glicosiladas (Fernández-Fernández y col., 2002a). También se detectaron estos péptidos acetilados en los viriones purificados a partir de plantas infectadas de *N. benthamiana* y de *Arabidopsis* (Fig. IV.5 y tabla IV.1). Además se observaron en los espectros otros picos que pueden corresponder a formas fosforiladas del péptido 1-39 (con un incremento de masa de 80 Daltones), modificado o no por *O*-GlcNAcilación y acetilación (Fig. IV. 2 y Tabla IV.1). El hecho de que se detecten en los espectros de los viriones purificados de *N. benthamiana* y de *Arabidopsis* Col-0 silvestre picos tenues que podrían corresponder a la forma fosforilada del péptido 1-39 di-*O*-GlcNAcilado, indica que tres residuos de serina o treonina, entre los primeros 39 aa de la CP del PPV podrían estar modificados al mismo tiempo.

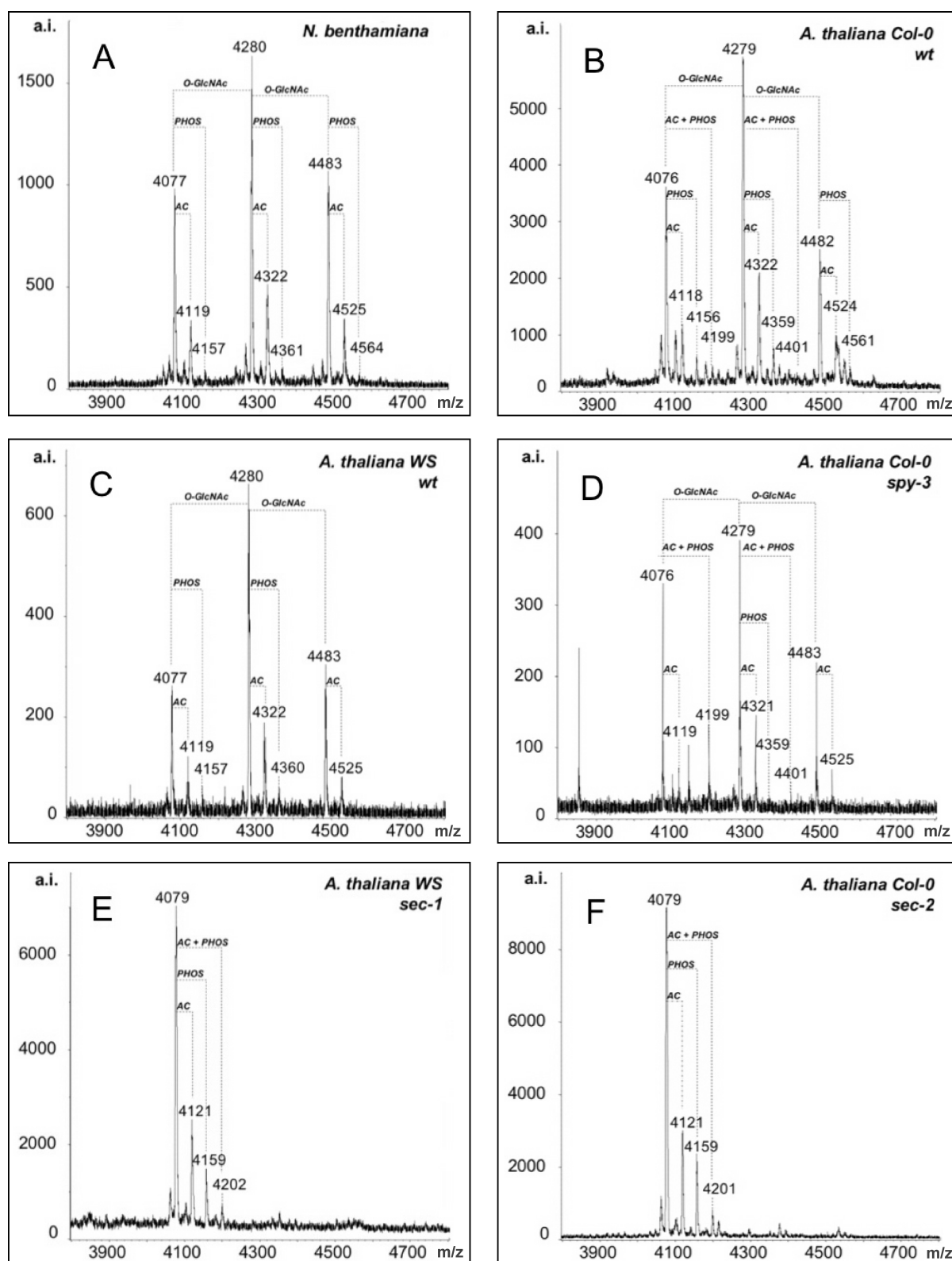


Figura IV.5. Análisis por MALDI-TOF de viriones del PPV purificados a partir de las plantas que se indican en cada panel, digeridos con tripsina. Se indica la relación masa/carga (m/z en Daltones) asignada a los picos que se derivan del péptido 1-39 de la CP, sin o con modificaciones postraduccionales. O-GlcNAc, O-GlcNAcilación; PHOS, fosforilación; AC, acetilación; a.i., intensidad arbitraria; wt, genotipo silvestre.

Tabla IV.1. m/z de señales de MALDI-TOF que pueden corresponder a formas modificadas del péptido 1-39 de la CP del PPV^a

		no glicosilado				mono <i>O</i> -GlcNAc				di <i>O</i> -GlcNAc		
		–	AC +42	PHOS +80	AC, PHOS +42 +80	– +20 3	AC +203 +42	PHOS +203 +80	AC, PHOS +203 +42 +80	– +406	AC +406 +42	PHOS +406 +80
<i>A. thaliana</i> Col-0	silvestre	4076	4118	4156	4198	4279	4321	4358	4401	4481	4524	4561
	<i>sec-2</i>	4078	4120	4158	4200	–	–	–	–	–	–	–
	<i>spy-3</i>	4076	4118	–	4198	4279	4321	4358	4400	4482	4525	–
<i>A. thaliana</i> WS	silvestre	4077	4118	4156	–	4279	4321	4359	–	4482	4524	–
	<i>sec-1</i>	4079	4121	4159	4201	–	–	–	–	–	–	–
<i>N. benthamiana</i>	silvestre	4077	4118	4157	–	4280	4321	4360	–	4483	4524	4564

^a AC, acetilado; PHOS, fosforilado; –, sin acetilar ni fosforilar

IV.2. IDENTIFICACIÓN DE DOS SITIOS MODIFICADOS CON *O*-GlcNAc EN LA REGIÓN N-TERMINAL DE LA CP DEL PPV

IV.2.1. Mutantes del PPV con sustituciones T19A, T24A y S25A en su CP son viables en plantas de *N. clevelandii*

Como mostraron los análisis de MALDI-TOF descritos en la sección IV.1, hay dos residuos *O*-GlcNAc modificando alguno(s) de los primeros 39 aa de la CP del PPV. Esta región de la CP incluye cuatro posibles dianas de *O*-GlcNAcilación, las serinas Ser-16 y Ser-25 y las treoninas Thr-19 y Thr-24. El hecho de que no se detectara ninguna glicosilación en el péptido 1-39 de un virus recombinante que conserva Ser-16 pero no Thr-19, Thr-24 y Ser-25, sugirió que dos de estos tres últimos residuos están mono *O*-GlcNAcilados, o uno de ellos está di *O*-GlcNAcilado (Fernández-Fernández y col., 2002a). Por esta razón se decidió evaluar el efecto sobre la infección del PPV de la eliminación de estas posibles dianas de *O*-GlcNAcilación sustituyendo Thr-19, Thr-24 y Ser-25 por alaninas (Fig. IV.6).

Cada una de las mutaciones se introdujo en el clon de cDNA pICPPV-NK-1GFP que permite la inoculación del PPV por bombardeo con partículas de oro y la monitorización de la infección visualizando la fluorescencia de la GFP con un microscopio o a simple vista con una lámpara de mano. Los tres mutantes resultaron ser infecciosos, causando síntomas y patrones de fluorescencia similares a los del virus silvestre (Fig. IV.7A). Los niveles de

acumulación viral, evaluados por análisis de western, también eran indistinguibles de los del PPV silvestre (Figura IV.7B). El mismo resultado se obtuvo cuando a la progenie viral de las plantas infectadas se le dio un pase en nuevas plantas de *N. clevelandii*.

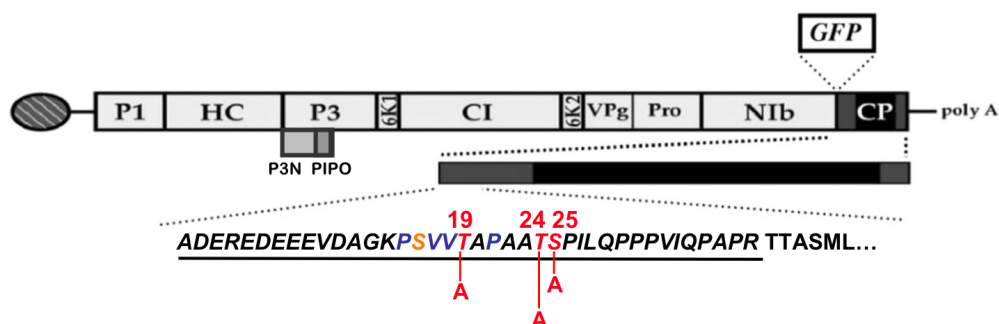


Figura IV.6. Localización de los residuos candidatos a ser *O*-GlcNAcilados en la CP del PPV. En el interior de la caja que representa a la poliproteína viral se muestran los productos proteicos que genera su procesamiento proteolítico. La CP se divide en tres regiones marcadas en gris (N-terminal y C-terminal) y negro (central). En la parte superior se muestra el gen de la GFP, usado como reportero. La secuencia del péptido triptico que va desde el aminoácido 1 al 39 está subrayada. Las mutaciones analizadas se indican en rojo. Otros residuos que pudieran ser importantes para el reconocimiento de los sitios a ser modificados se muestran en azul (P y V) o en naranja (S).

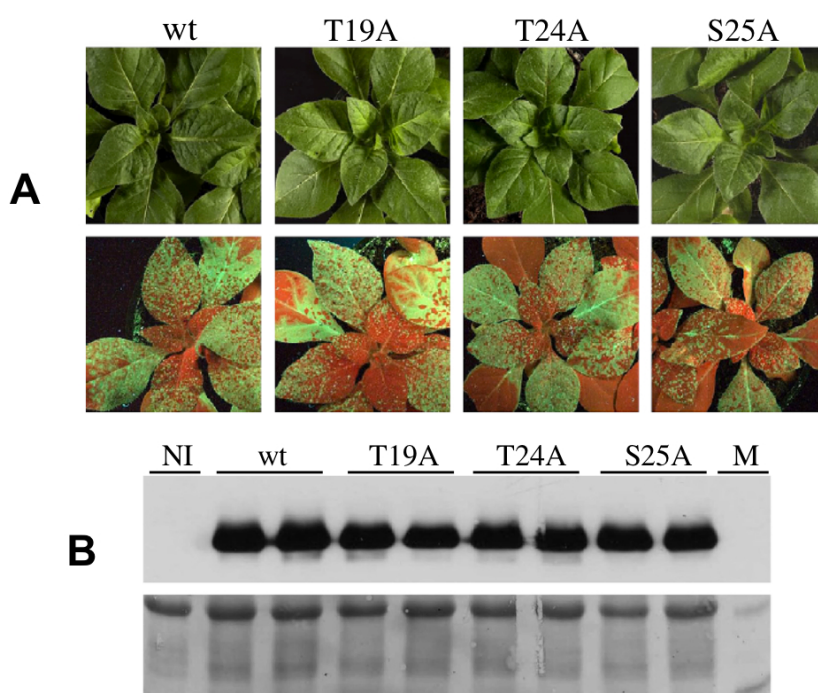


Figura IV.7. Infección de *N. clevelandii* con PPV-NK-1GFP con las mutaciones T19A, T24A y S25A. A) Fotos de plantas infectadas con los virus mutantes indicados (wt, PPV silvestre), tomadas a los 18 dpi bajo luz visible (paneles superiores), o bajo irradiación UV con una lámpara de mano (paneles inferiores). B) Análisis de western con suero anti CP del PPV de extractos de plantas infectadas con los virus indicados (wt, PPV silvestre; NI, planta no inoculada), recolectadas a los 21 dpi. En la parte inferior se muestra la membrana teñida con rojo Ponceau, como control de carga. El carril M muestra marcadores de masa molecular de 47.5 y 32.5 kDa preteñidos (New England Biolabs).

Un análisis por IC-RT-PCR de la progenie viral detectó delecciones parciales del inserto GFP en algunas de las plantas infectadas con los mutantes o con el virus silvestre, pero no se observaron reversiones de las mutaciones introducidas ni mutaciones compensatorias adicionales en ninguno de los casos (datos no mostrados).

IV.2.2. Thr-19 y Thr-24 de la CP del PPV están modificadas por un único residuo *O*-GlcNAc

Se purificaron viriones del PPV a partir de plantas infectadas con PPV T19A, PPV T24A y PPV S25A. Los viriones purificados se digirieron parcialmente con tripsina y se sometieron a análisis por MALDI-TOF. Se detectaron señales del péptido 1-39 sin modificar,

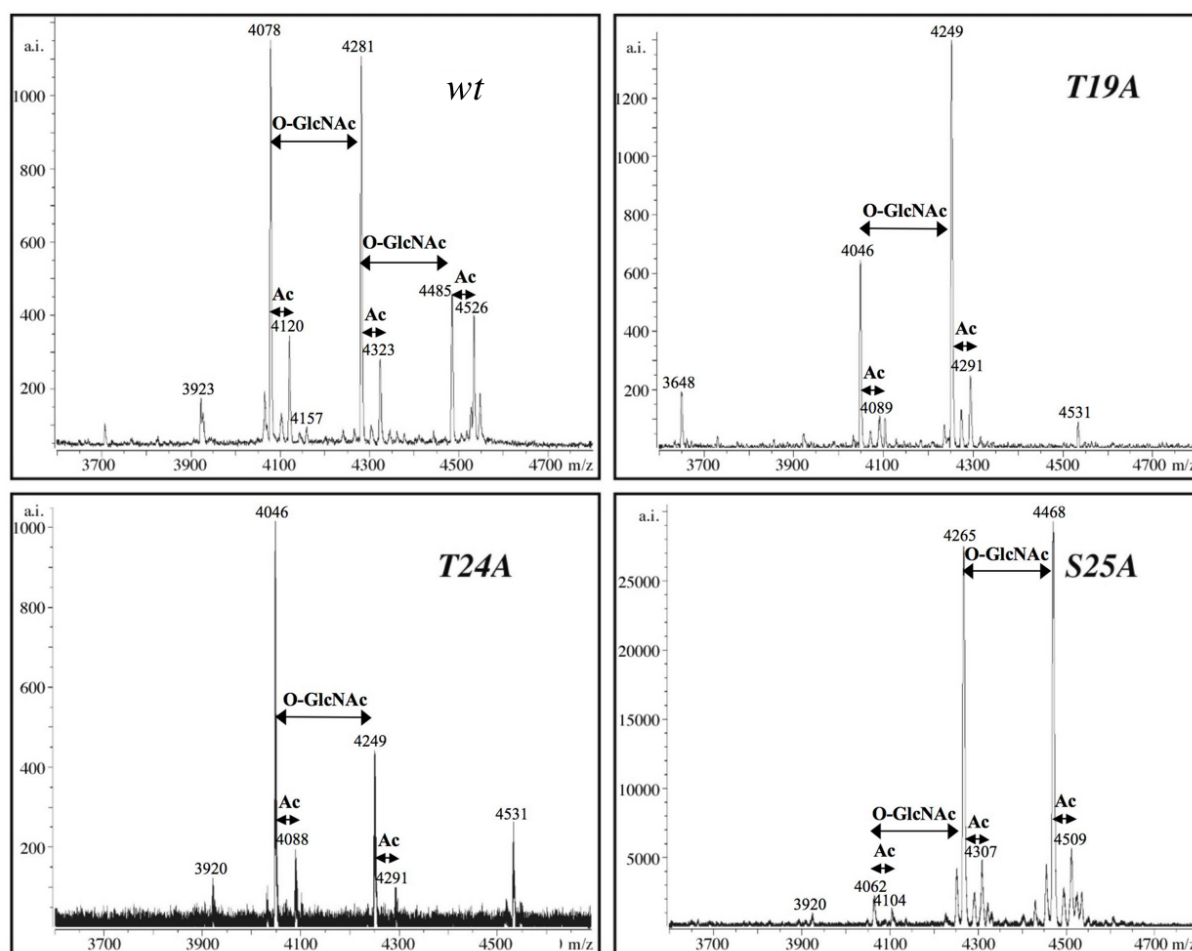


Figura IV.8. Análisis por MALDI-TOF de viriones de PPV silvestre (wt) y de los mutantes indicados en cada panel, digeridos con tripsina. Se indica la relación masa/carga (m/z, en Daltones) asignada a los picos más relevantes. *O*-GlcNAc, modificación por *O*-GlcNAcilación; Ac, acetilación; a.i., valores de intensidad arbitrarios.

acetilado y *O*-GlcNAcilo. El espectro del mutante PPV S25A presentaba las mismas formas no glicosiladas, mono- y di-glicosiladas, observadas en el péptido 1-39 del PPV silvestre (Fig. IV.8), lo que sugiere que Ser-25 no está modificada, y tanto Thr-19 como Thr-24 podrían estarlo. El hecho de que en los espectros de los viriones de PPV-T19A y PPV-T24A solo se observen formas noglicosiladas y mono-glicosiladas del péptido 1-39 indica dos cosas: que ambas treoninas se pueden modificar, y que cada modificación añade un monosacárido *O*-GlcNAc (Fig. IV.8).

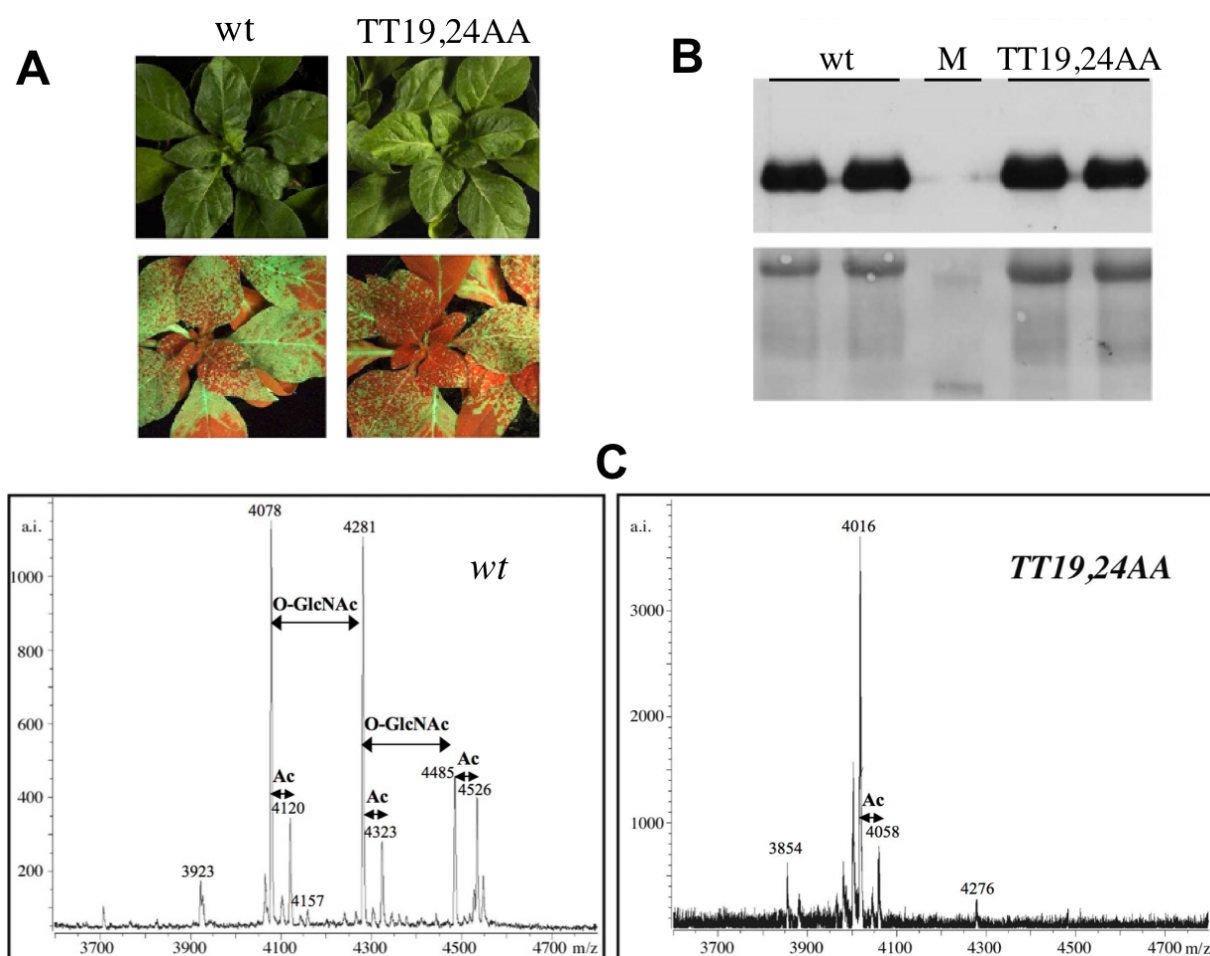


Figura IV.9. **Infección del doble mutante PPV-NK-IGFP TT19,24AA en *N. clevelandii*.** A) Fotos de plantas infectadas con PPV silvestre (wt) o con PPV TT19,24AA, tomadas a los 18 dpi bajo luz visible (imágenes superiores), o bajo irradiación UV con una lámpara de mano (imágenes inferiores). B) Análisis de western con suero anti CP de PPV de extractos de plantas infectadas con PPV silvestre (wt) o con PPV TT19,24AA recolectadas a los 21 dpi. En la parte inferior se muestra la membrana teñida con rojo Ponceau como control de carga. El carril M muestra marcadores de masa molecular de 47.5 y 32.5 kDa preteñidos (New England Biolabs). C) Análisis por MALDI-TOF de viriones purificados del PPV silvestre (wt) y PPV TT19,24AA digeridos con tripsina. Se indica la relación masa/carga (m/z en Daltones) asignada a los picos más relevantes. *O*-GlcNAc, modificación por *O*-GlcNAcilación; Ac, acetilación; a.i., valores de intensidad arbitrarios.

El análisis de los viriones con mutaciones puntuales no descarta la posibilidad de que Ser-25 pudiera *O*-GlcNAcilarse exclusivamente cuando ninguna de las treoninas estuviera modificada. Para evaluar esta posibilidad se generó un doble mutante del PPV en el que tanto Thr-19 como Thr-24 se sustituyeron por alaninas (TT19,24AA). No se observaron diferencias apreciables en infectividad, sintomatología o acumulación viral en *N. clevelandii* entre PPV TT19,24AA y PPV silvestre (Fig. IV.9). La estabilidad de la doble mutación en la progenie viral se verificó por análisis de secuencia de un fragmento de cDNA viral amplificado por IC-RT-PCR.

El análisis por MALDI-TOF de viriones de PPV TT19,24AA solo detectó la forma no glicosilada del péptido 1-39 (Fig. IV.9C). Esto demuestra que la Ser-25 no se puede *O*-GlcNAcilar, incluso cuando los residuos adyacentes no han sido modificados.

IV.2.3. La *O*-GlcNAcación de la CP en Thr-19 y Thr-24 no es necesaria para la infección del PPV en *Prunus*

El PPV presenta un amplio espectro de huéspedes, que incluye especies herbáceas y leñosas. Así pues, dado que la pérdida de la *O*-GlcNAcación de la Thr-19 y Thr-24 no tenía efectos apreciables en la infección viral en *N. clevelandii*, se evaluó si la modificación de estos residuos era relevante para la infección del PPV en uno de sus huéspedes naturales, *P. persica*. Puesto que pICPPV-NK-1GFP proviene de un aislado del PPV que después de propagarse en huéspedes herbáceos por un largo periodo de tiempo, ha perdido su capacidad de infectar plantas leñosas, se introdujeron las mutaciones T19A, T24A y TT19,24AA en pICPPV-5'BDGFP, un clon cDNA infeccioso de un aislado del PPV capaz de infectar *P. persica*. Se inocularon por biolística plántulas de *P. persica* GF305 con los diferentes plásmidos derivados de pICPPV-5'BDGFP. No se observaron diferencias en infectividad, en la inducción de síntomas, expresión de GFP, o acumulación viral entre los virus mutantes y el PPV silvestre (Fig. IV.10).

La secuenciación de fragmentos de cDNA apropiados amplificados por IC-RT-PCR demostró que todas las mutaciones introducidas eran también estables en la progenie viral acumulada en los melocotoneros infectados (datos no mostrados).

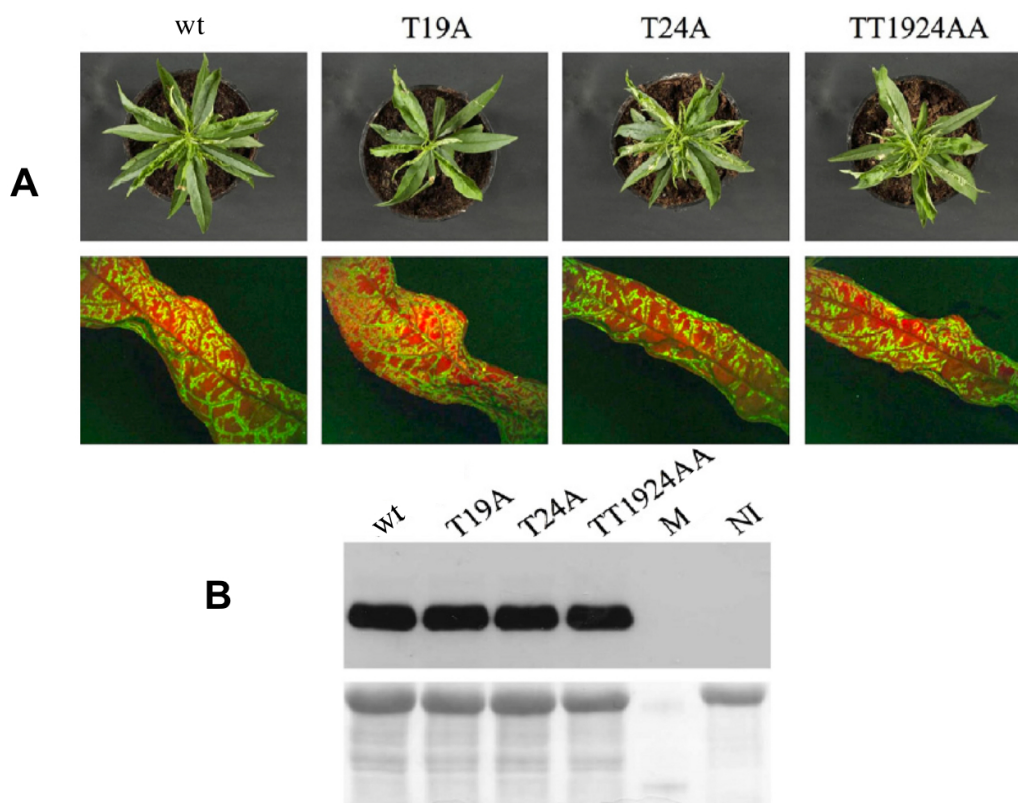


Figura IV.10. **Infección de PPV-5'BDGFP con las mutaciones T19A, T24A y TT19,24AA en *P. persica*.** A) Fotos de plantas infectadas con los virus indicados (wt, PPV silvestre), tomadas a los 18 dpi bajo luz visible (imágenes superiores) o bajo irradiación UV con un microscopio de fluorescencia (imágenes inferiores). B) Análisis de western con suero anti CP de PPV de extractos de plantas infectadas con los virus indicados (wt. PPV silvestre; NI, planta no inoculada), recolectadas a los 21 dpi. En la parte inferior se muestra la membrana teñida con rojo Ponceau como control de carga. El carril M muestra marcadores de masa molecular de 47.5 y 32.5 kDa preteñidos (New England Biolabs).

IV.3. LOCALIZACIÓN DE SITIOS DE *O*-GlcNAcILACIÓN EN LA CP DEL PPV FUERA DEL PÉPTIDO 1-39

IV.3.1. Localización de sitios de *O*-GlcNAcILación en la CP del PPV en la región 40-43

Un análisis de expresión heteróloga en *Escherichia coli* de la proteína SEC de *A. thaliana* y variantes mutadas de la CP del PPV había sugerido que, además de a Thr-19 y Thr-24, SEC también modificaba a Thr-41 y a Ser-43 (Scott y col., 2006). Para corroborar la existencia de sitios de *O*-GlcNAcILación fuera del péptido tríptico 1-39, se realizó un nuevo análisis de MALDI-TOF de viriones purificados a partir de plantas de *N. clevelandii*. Este análisis mostró la existencia de un segundo péptido tríptico *O*-GlcNAcILado (aa 40-93), que parecía ser capaz de aceptar al menos 4 residuos *O*-GlcNAc (Fig. IV.11).

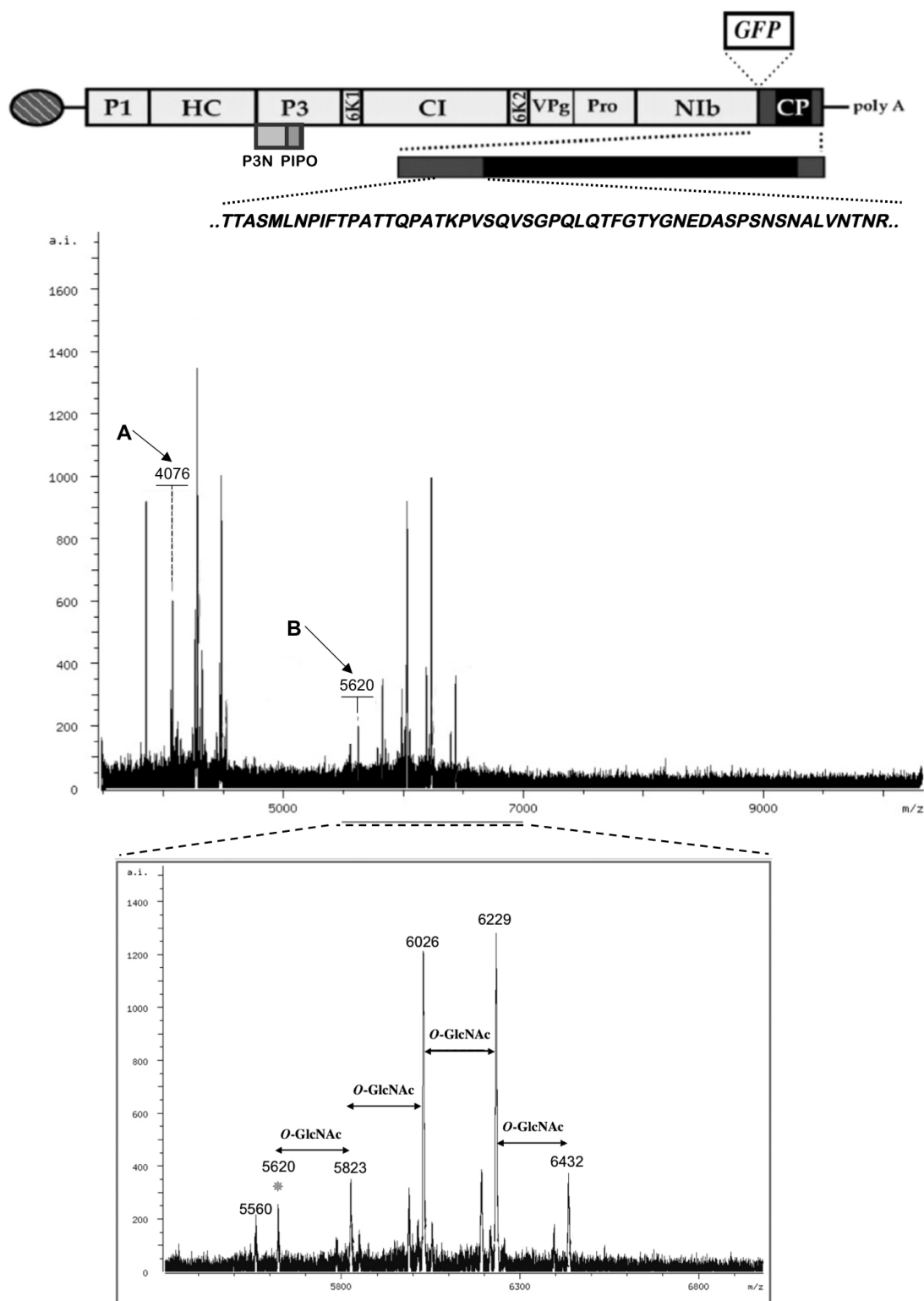


Figura IV.11. **O-GlcNAc**ilación del péptido tríptico 40-93 de la CP del PPV. En la parte superior se muestra la secuencia del péptido tríptico 40-93 y su localización en la región codificante de la CP y en el genoma del PPV. Las diferentes proteínas se muestran en las cajas que representan a los ORF del PPV. Las cajas grises y negras representan a las regiones N- y C-terminal (grises) y central (negra) de la CP. En la parte inferior se muestra el espectro de MALDI-TOF de viriones del PPV silvestre, digeridos con tripsina completo, incluyendo las regiones correspondientes al péptido 1-39 (A) y al péptido 40-93 (B) y una ampliación de esta segunda región. Se indica la relación masa/carga (m/z en Daltones) asignada a los picos más relevantes. El asterisco señala al pico correspondiente al péptido 40-93 sin glicosilar. O-GlcNAc, O-GlcNAc-ilación; a.i. valores de intensidad arbitrarios.

Como las modificaciones hechas por SEC en *E. coli* tenían lugar en los primeros 43 aa (Scott y col., 2006), se realizó un mapeo mutacional para determinar si los sitios modificados en el sistema heterólogo, también lo son en plantas. Se introdujeron una serie de mutaciones en los clones cDNA de PPV infecciosos pICPPV-NK-1GFP (para infectar *N. clevelandii*) y

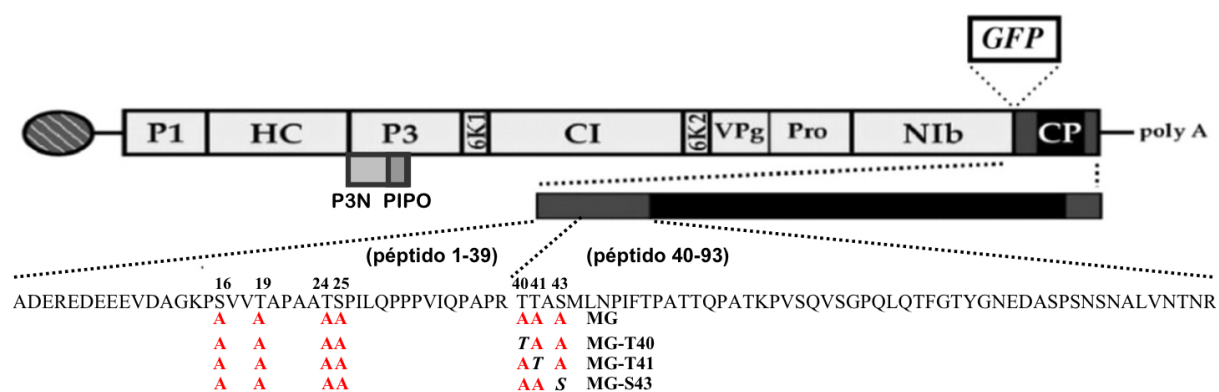


Figura IV.12. Localización de residuos mutados en la región N-terminal de la CP del PPV. Las diferentes proteínas del PPV se muestran en las cajas que representan a los ORF del PPV. Las cajas grises y negras representan a las regiones N- y C-terminal (grises) y central (negras) de la CP. Las secuencias de los péptidos trópicos 1-39 y 40-93, con las sustituciones introducidas en cada mutante, se muestran debajo.

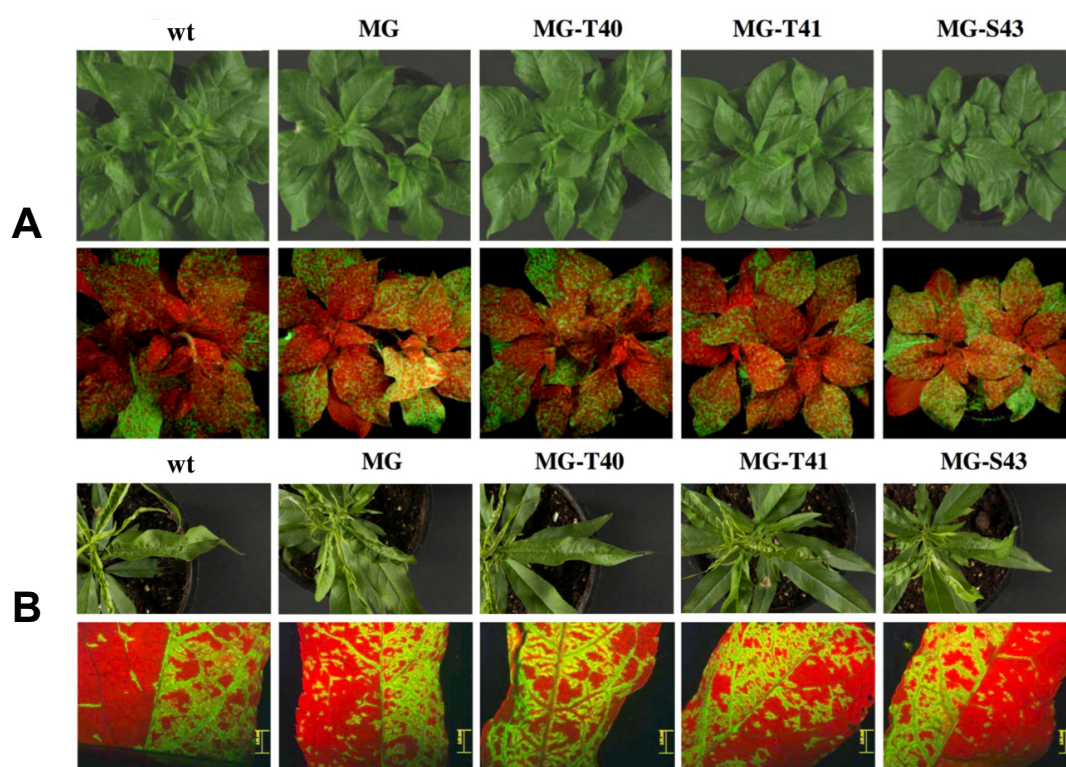


Figura IV.13. Infección de PPV-NK-1GFP y PPV-5'BDGFP con las mutaciones múltiples MG, MG-T40, MG-T41 y MG-S43. Fotos de plantas de *N. clevelandii* (A) y de *P. persica* (B) infectadas con los virus indicados (wt, PPV silvestre), tomadas a los 18 dpi, bajo luz visible (imágenes superiores), o bajo irradiación UV con una lámpara de mano (A) o con un microscopio de fluorescencia (B) (imágenes inferiores).

pICPPV-5'BDGFP (para infectar *P. persica*). El primer mutante (MG) tenía reemplazados por Ala todos los residuos de Ser y Thr en los primeros 43 aa de la CP. Los mutantes restantes restauraban uno a uno las treoninas Thr-40 (MG-T40), Thr-41 (MG-T41) o la serina Ser-43 (MG-S43) en el mutante MG (Fig. IV.12).

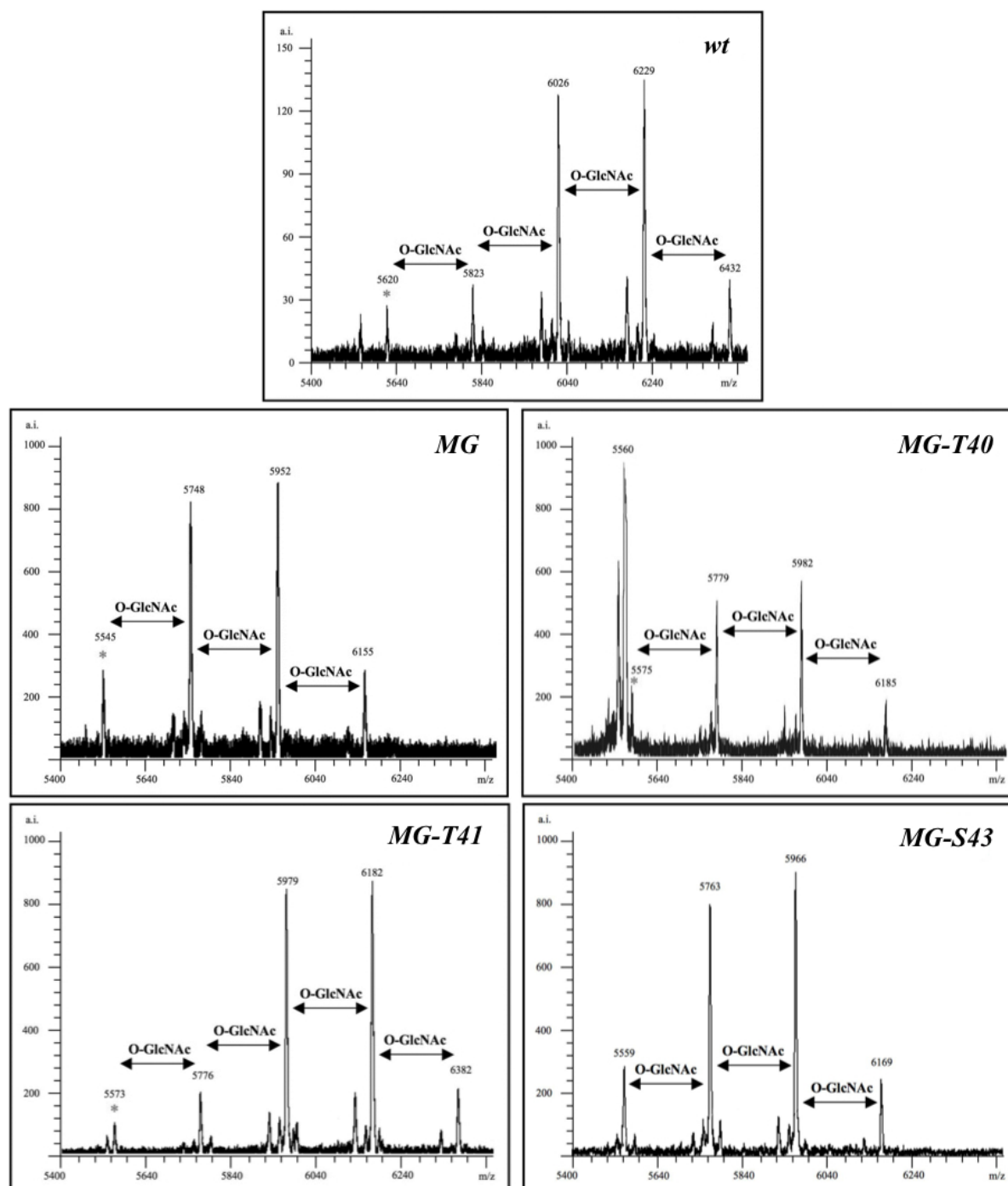


Figura IV.14. Localización de un residuo *O*-GlcNAc en la secuencia 40-43 de la CP del PPV. Espectros de MALDI-TOF de viriones del PPV silvestre (wt) y de los mutantes indicados, digeridos con tripsina, de la región correspondiente al péptido 40-93. Se indica la relación masa/carga (m/z en Daltones) de los picos más relevantes. Los asteriscos señalan al pico correspondiente a la forma no glicosilada del péptido 40-93. *O*-GlcNAc, *O*-GlcNAcación; a.i., valores de intensidad arbitrarios.

Todos los mutantes resultaron ser infecciosos, causando síntomas y patrones de fluorescencia similares a los del virus silvestre tanto en *N. clevelandii* (Fig. IV.13A) como en *P. persica* (Fig. IV.13B).

La secuenciación de fragmentos de cDNA apropiados amplificados por IC-RT-PCR demostró que todas las mutaciones introducidas eran estables en la progenie viral tanto de *N. clevelandii* como de *P. persica* (datos no mostrados). Asimismo, se volvieron a detectar deleciones parciales del inserto de la GFP en las progenies de clones derivados de pICPPV-NK-lGFP, pero no en las de los clones derivados de pICPPV-5'BDGFP (datos no mostrados).

En el análisis por MALDI-TOF de los viriones purificados a partir de plantas infectadas con los mutantes MG, MG-T40 y MG-S43 solo se detectaron formas no modificadas, mono-, di- y tri-*O*-GlcNAcildas del péptido tríptico 40-93 (Fig. IV.14). En cambio, el espectro del mutante MG-T41 (en el que se había restablecido la Thr-41) mostraba todas las formas observadas en la CP del PPV silvestre (no modificada, mono-, di- tri y tetra-*O*-GlcNAcildas). Estos datos indican la existencia de modificaciones adicionales en la región 40-93, más allá del residuo 43, y sugieren fuertemente que Thr-41, pero no Thr-40 y Ser-43, se encuentra *O*-GlcNAcilda.

IV.3.2. Localización de sitios de *O*-GlcNAcilación en la CP del PPV en la región 44-93

Mientras se desarrollaba el trabajo de esta tesis, Kim y col. (2011) mostraron por ETD MS/MS que SEC *O*-GlcNAcila a Thr-19, Thr-24, Thr-41, Thr-53 y Ser-65 en *E. coli*. Para

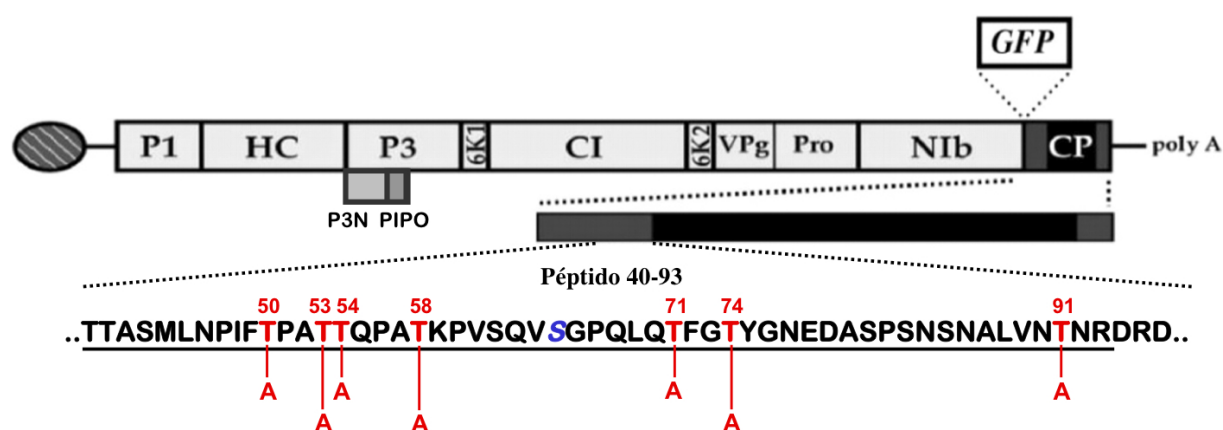


Figura IV.15. **Localización de los residuos mutados en la región 44-93 de la CP del PPV.** Las diferentes proteínas del PPV se muestran en las cajas que representan a los ORF del PPV. Las cajas grises y negras representan a las regiones N- y C-terminal (grises) y central (negra) de la CP. La secuencia del péptido tríptico 40-93, con las sustituciones introducidas en cada mutante, se muestra subrayada dentro de la secuencia de la CP del PPV. La serina 65 cuya *O*-GlcNAcila se demostró en el sistema de expresión de *E. coli* (Kim y col., 2011) y en este estudio (Fig. IV.18 y Tabla IV.2) está en azul y en cursiva.

conseguir la información más completa posible sobre los residuos *O*-GlcNAc de la CP durante la infección del PPV, se prosiguió con un abordaje combinado de análisis mutacional de la región 44-93 y de espectrometría ETD MS/MS de la CP silvestre. Todos los residuos de treonina de la región 44-93 de la CP se reemplazaron uno a uno por alaninas en el clon pICPPV-NK-IGFP (Fig. IV.15).

Ninguna de las mutaciones causó un efecto apreciable sobre la infectividad o la sintomatología del virus (Fig. IV.16A) ni sobre sus niveles de acumulación (Fig. IV.16B). Además, análisis por IC-RT-PCR y secuenciación de los productos amplificados mostraron que las mutaciones se mantenían en todas las progenies virales (datos no mostrados).

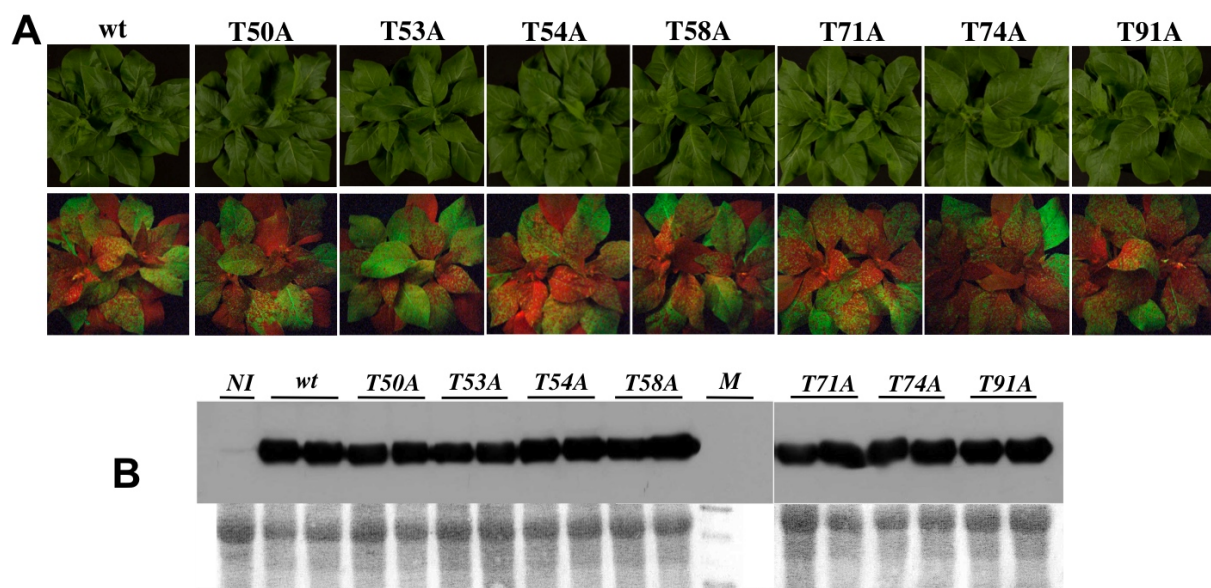


Figura IV.16. Infección de PPV-NK-IGFP con mutaciones puntuales en la región 40-93 de la CP en plantas de *N. clelandii*. A) Fotos de plantas infectadas con los virus indicados sobre cada una de ellas, tomadas a los 20 dpi bajo luz visible (imágenes superiores) o bajo irradiación UV (imágenes inferiores). B) Análisis de western con suero anti CP de PPV de extractos de plantas infectadas con los virus indicados sobre cada carril (wt, PPV silvestre; NI, planta no infectada) recolectadas a los 21 dpi. En la parte inferior se muestra la membrana teñida con rojo Ponceau, como control de carga. El carril M muestra marcadores de masa molecular de 47.5 y 32.5 kDa preteñidos (New England Biolabs).

El análisis por MALDI-TOF de los viriones purificados a partir de plantas infectadas no mostró reducción del número de residuos de *O*-GlcNAc asociada a las mutaciones T71A, T74A y T91A (Fig. IV.17). Por el contrario, las mutaciones T50A, T53A, T54A y T58A reducían el número de *O*-GlcNAcificaciones del péptido 40-93 de cuatro a dos o tres (Fig. IV.17). Las mutaciones T50A y T53A son las que mostraron un efecto más drástico en el

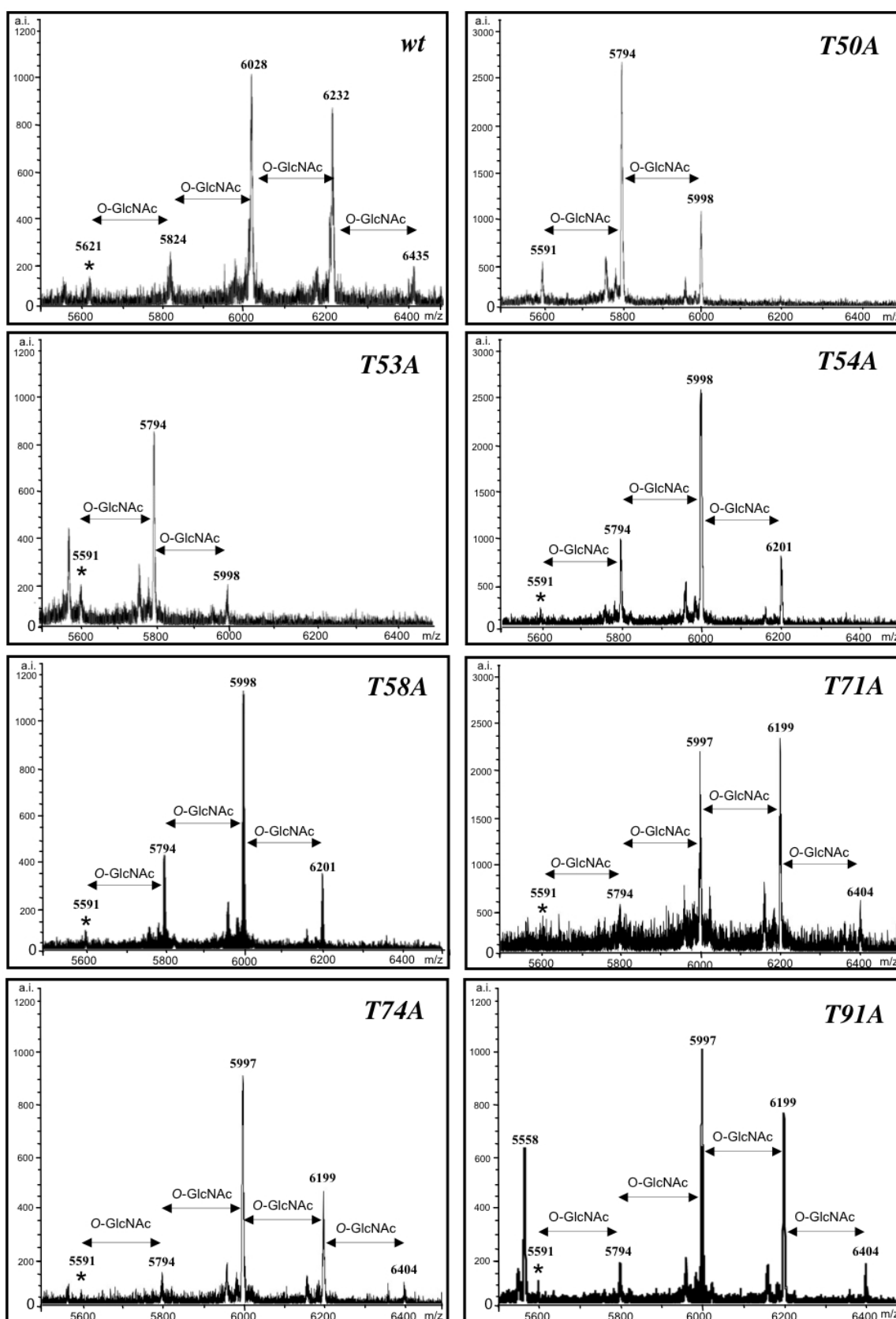


Figura IV.17. Efecto de mutaciones puntuales de T a A en la *O*-GlcNAcilación del péptido 40-93 de la CP del PPV. Espectros de MALDI-TOF de viriones del PPV silvestre (wt) y de los mutantes indicados, digeridos con tripsina, en la región correspondiente al péptido 40-93. Se indica la relación masa/carga (m/z en Daltones) de los picos más relevantes. Los asteriscos señalan al pico correspondiente a la forma no modificada del péptido 40-93. *O*-GlcNAc, *O*-GlcNAcilación; a.i., valores de intensidad arbitrarios.

perfil de modificación: en los espectros de MALDI-TOF de los mutantes CP-T50A y CP-T53A la intensidad del pico correspondientes a la forma di-*O*-GlcNAcilada, el pico más intenso en el espectro del PPV silvestre, era menor que la del pico correspondiente a la forma mono *O*-GlcNAcilada, y el péptido tri-*O*-GlcNAcilado era muy escaso en la muestra CP-T50A e indetectable en la muestra CP-T53A (Fig. IV.17). Cada una de las mutaciones T54A y T58A parecía afectar a un solo evento de *O*-GlcNAcilación, ya que el pico correspondiente a la forma tri-*O*-GlcNAcilada del péptido 40-93 era claramente detectable (Fig. IV.17). En conjunto, estos datos indican que Thr-19, Thr-24, Thr-41, Thr-50, Thr-53, Thr-54 y Thr-58 o se *O*-GlcNAcilan o influyen en la *O*-GlcNAcilación de otros sitios.

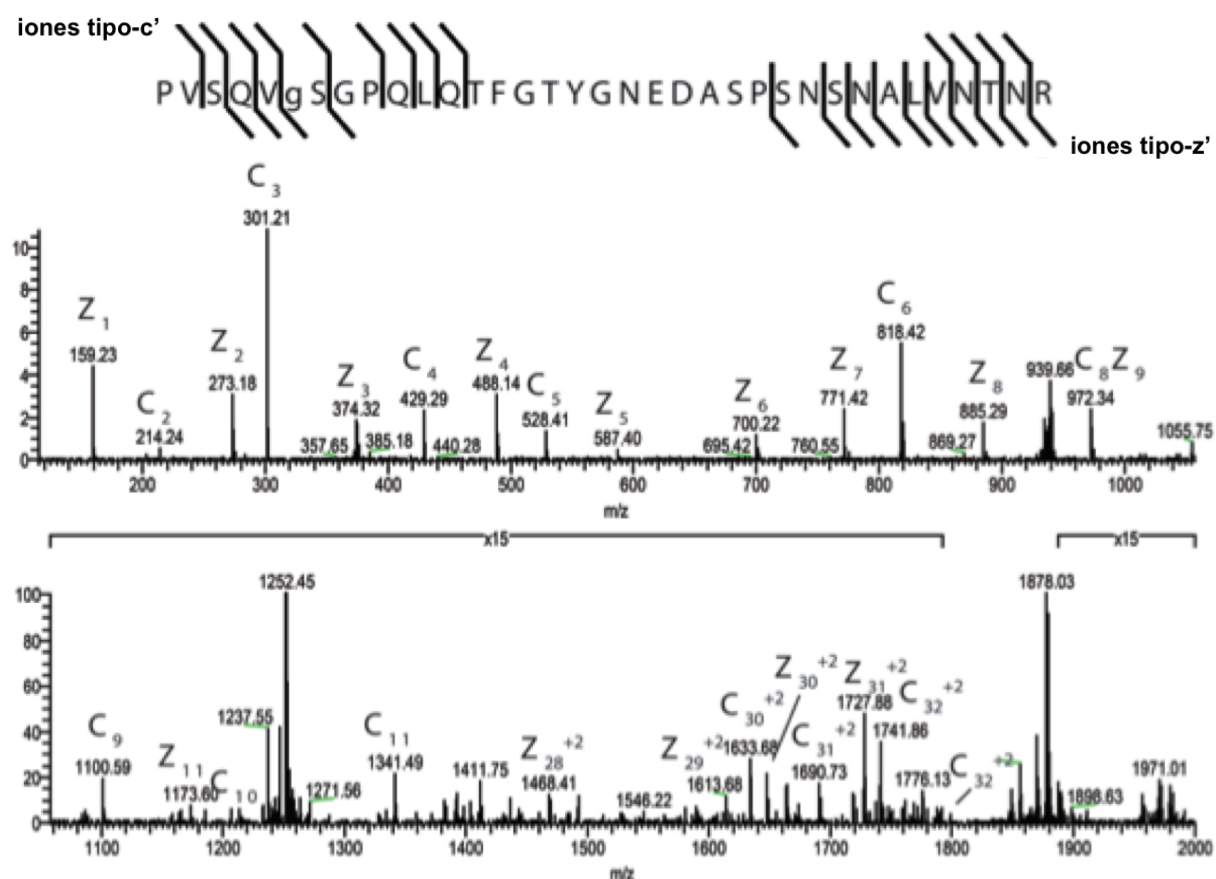


Figura IV.18. Espectro de ETD MS/MS registrado en iones $[M + 4H]^+ + 4$ (m/z 939.46) correspondientes al péptido PVSQVSGPQLQTFGTGYNEDASPSNSNALVNTNR (Tabla IV.2). Para adquirir este espectro, se usó en el modo dependiente de datos un espectrómetro de masas LTQ preparado para ETD. Los iones fragmentados con carga +1 o +2, marcados en el espectro, indican que el residuo *O*-GlcNAc está localizado en Ser-65 de la CP del PPV. m/z , relación masa/carga.

Cuando se analizaron por LC-MS/MS los péptidos obtenidos por digestión de viriones de PPV silvestre con tripsina y proteasa LysC, se detectaron péptidos de las regiones 1-39 y

40-93 con hasta dos y cinco residuos *O*-GlcNAc, respectivamente. El análisis de algunos de estos péptidos por ETD MS/MS demostró que Thr-19, Thr-24, Thr-41, Thr-53, Ser-65 y Thr-54 y/o Thr-58 pueden *O*-GlcNAcilarse (Fig. IV.18 y Tabla IV.2).

Tabla IV.2 Localización por ETD MS de modificaciones *O*-GlcNAc en la CP del PPV

Modificación	Sitio de la Proteína	Péptido Modificado
<i>O</i> -GlcNAc	T19	ADEREDEEEVDAGKPSVVT [#] APAAT [#] SPILQPPVQPAPR
<i>O</i> -GlcNAc	T24	ADEREDEEEVDAGKPSVVTAPAAT [#] SPILQPPVQPAPR
2 <i>O</i> -GlcNAc	T19 & T24	ADEREDEEEVDAGKPSVVT [#] APAAT [#] SPILQPPVQPAPR
<i>O</i> -GlcNAc	(T40/T41) [^]	(TT) ^{#^} ASMLNPIFTPATTQPATK
2 <i>O</i> -GlcNAc	(T40/T41) [^] & T53	(TT) ^{#^} ASMLNPIFTPAT [#] TQPATK
<i>O</i> -GlcNAc	S65	PVSQVS [#] GPQLQTFGTGYNEDASPSNSNALVNTNR
<i>O</i> -GlcNAc	T41	TT [#] ASMLNPIFTPATTQPATKPVSVSGPQLQTFGTGYNEDASPSNSNALVNTNR
3 <i>O</i> -GlcNAc	T41 & T53 & S65	TT [#] ASMLNPIFTPAT [#] TQPATKPVSVSGPQLQTFGTGYNEDASPSNSNALVNTNR
4 <i>O</i> -GlcNAc	T41 & T53 & (T54/T58) [^] & S65	TT [#] ASMLNPIFTPAT [#] (TQPAT) ^{#^} KPVSVSGPQLQTFGTGYNEDASPSNSNALVNTNR

[#] = residuo *O*-GlcNAcilado.

[^] = los datos no permiten discriminar cual de las dos treoninas está *O*-GlcNAcilada.

IV.4. EFECTO DE LA *O*-GLCNACILACIÓN DE LA CP SOBRE LA INFECCIÓN DEL PPV

IV.4.1. La *O*-GlcNAcilación de la CP afecta de manera diferente a la infección del PPV en diferentes huéspedes

Puesto que las mutaciones de sitios de *O*-GlcNAcilación puntuales no tenían efectos apreciables sobre la infectividad, patogenicidad o acumulación virales en *N. clevelandii*, y las mutaciones se mantenían estables en la progenie viral, se intentó producir un efecto más drástico sobre la *O*-GlcNAcilación de la CP del PPV produciendo mutaciones múltiples.

Así pues, todas las treoninas cuyas mutaciones individuales habían mostrado un efecto sobre la *O*-GlcNAcilación de la CP (Thr-19, Thr-24, Thr-41, Thr-50, Thr-53, Thr-54 y Thr-58) se sustituyeron por alaninas (mutación CP7T/A) en los clones pICPPV-NK-IgFP y pICPPV-5'BDGFP (Fig. IV.19). PPV-NK-IgFP CP7T/A resultó ser infeccioso en *N. clevelandii*, y el análisis por MALDI-TOF de viriones purificados a partir de las plantas infectadas mostró que los siete cambios de T a A abolían la *O*-GlcNAcilación tanto del péptido 1-39 como del 40-93 (Fig. IV.19). Puesto que Ser-65 se mantiene presente en el mutante CP7T/A, pero la CP de este virus no está modificada, la *O*-GlcNAcilación de este residuo debe ser dependiente de determinantes de secuencia primaria alterados por las

múltiples mutaciones del virus CP7T/A o requiere la *O*-GlcNAcilación de otros residuos de la CP.

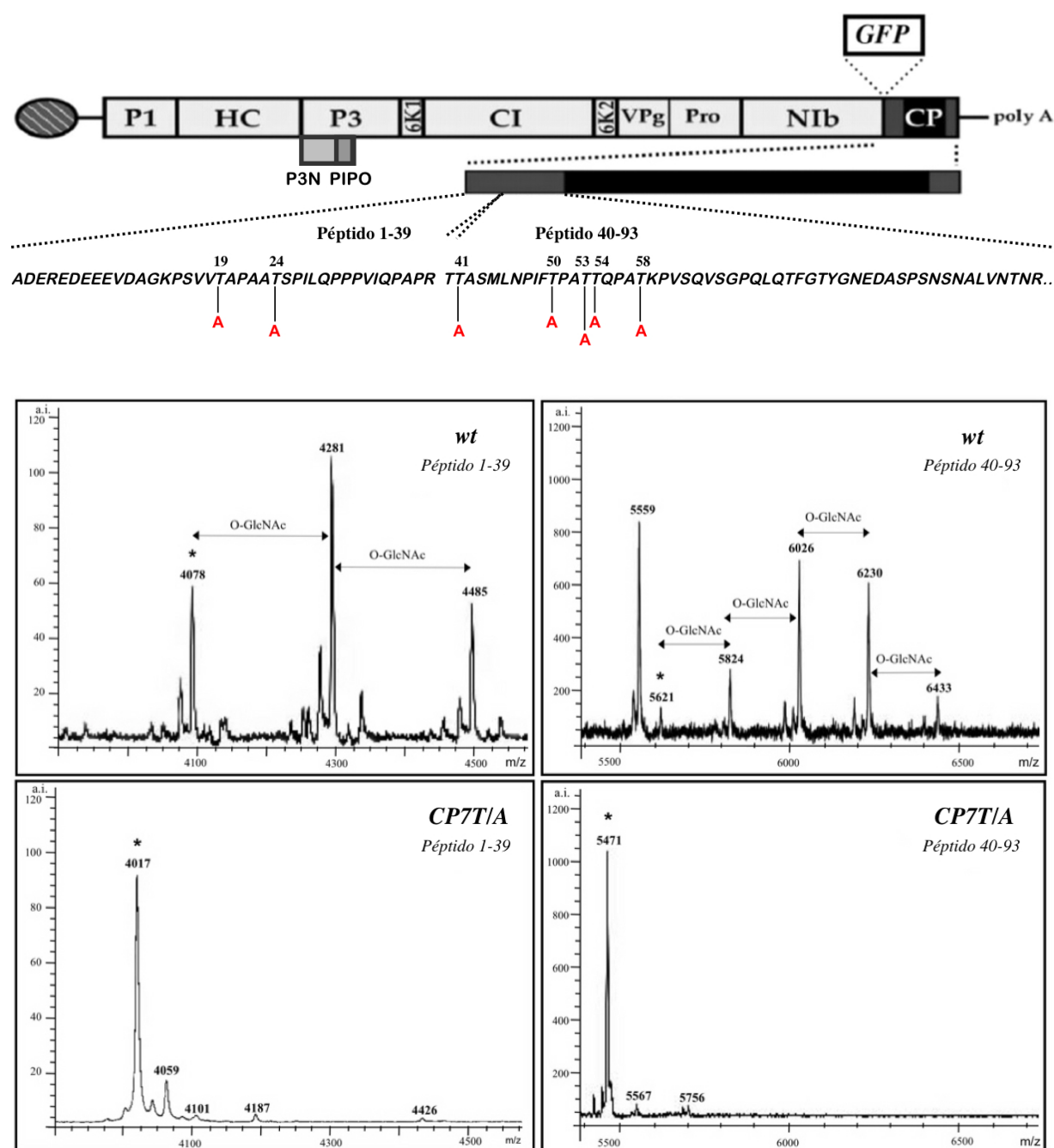


Figura IV.19. Análisis por MALDI-TOF de viriones del PPV silvestre y del mutante CP7T/A. En la parte superior se muestran las diferentes proteínas en forma de cajas que representan a los ORF del PPV. Las cajas grises y negras representan a las regiones N- y C-terminal (grises) y central (negra) de la CP. Así mismo se muestra la localización de los residuos mutados en las regiones 1-39 y 40-93 de la CP del PPV. En la parte inferior se muestran los espectros de MALDI-TOF en las regiones correspondientes a los péptidos 1-39 y 40-93. Se indica la relación masa/carga (m/z en Daltones) asignada a los picos más relevantes. Los asteriscos señalan a los picos correspondientes a los péptidos 1-39 y 40-93 sin glicosilar. wt, PPV silvestre; *O*-GlcNAc, *O*-GlcNAcilación; a.i., valores de intensidad arbitrarios.

PPV-NK-IGFP CP7T/A infectaba *N. clelandii* y *N. benthamiana* muy eficientemente, sin diferencias apreciables en síntomas o acumulación viral entre las plantas infectadas con el mutante CP7T/A o con el virus silvestre (Fig. IV.19). La mutación CP7T/A tampoco tenía un efecto drástico en la infección del PPV en *P. persica*: la infectividad y la patogenicidad de PPV-5'BD-CP7T/A en este huésped era similar a la del virus silvestre, y aunque el nivel de acumulación del virus mutante fue algo inferior al de PPV-5'BD silvestre, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (valor P 0.289) (Fig. IV.20).

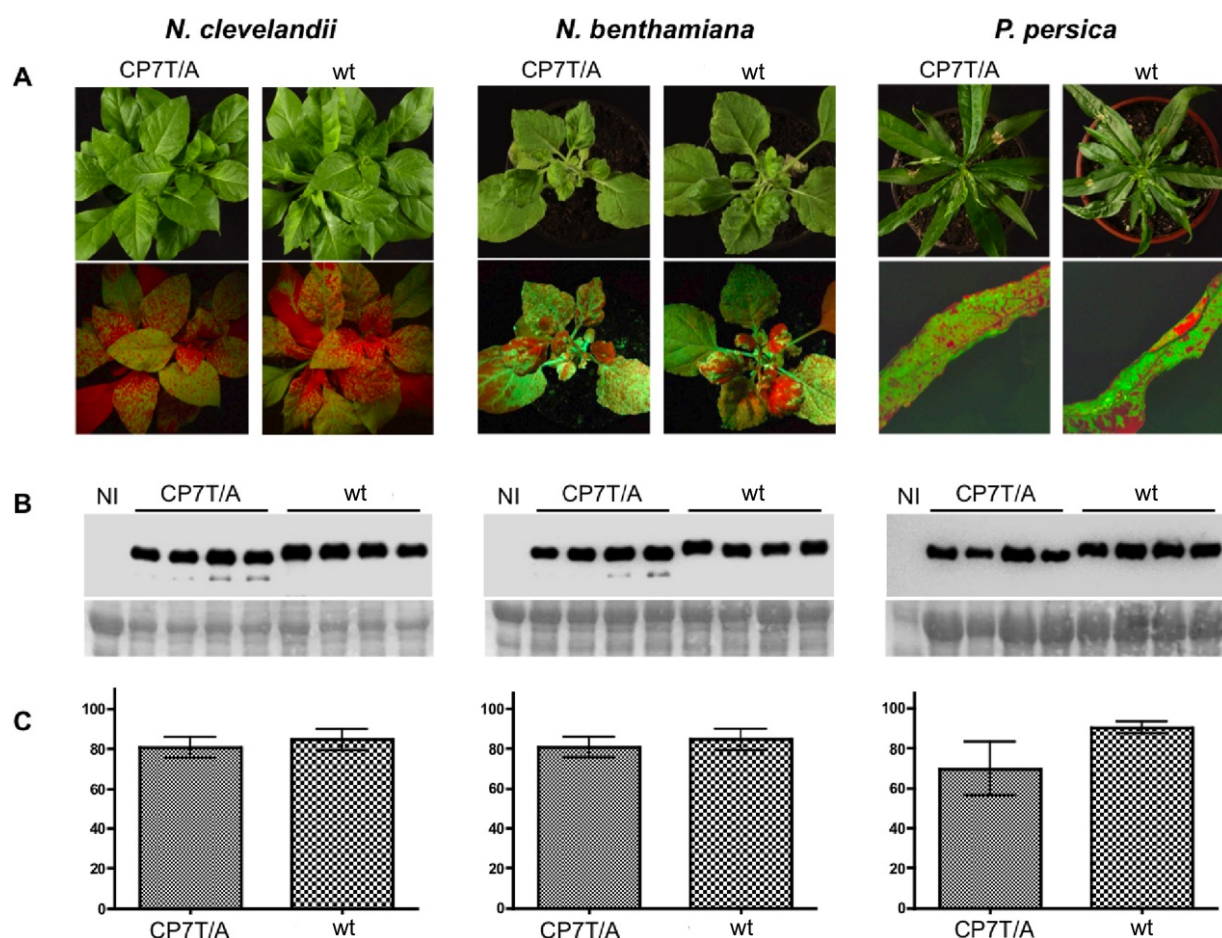


Figura IV.20. Infección de PPV-NK-IGFP-CP7T/A en *N. clelandii* y *N. benthamiana* y de PPV-5'BDGFP-CP7T/A en *P. persica*. A) Fotos de plantas infectadas con los PPVs silvestres (wt) o con los mutantes CP7T/A tomadas a 21 dpi bajo luz visible (imágenes superiores), o bajo irradiación UV (imágenes inferiores) con una lámpara de mano (*N. clelandii* y *N. benthamiana*) o con microscopio de fluorescencia (*P. persica*). B) Análisis de western blot con suero anti CP de PPV de extractos de cuatro plantas infectadas con los virus que se indican en cada caso (wt, virus silvestre) o de una planta no infectada (NI), recolectadas a 21 dpi. En la parte inferior se muestra la membrana teñida con rojo Ponceau como control de carga. C) Análisis densitométrico de las inmunorreacciones mostradas en (B). Los valores son porcentajes de la densidad de la banda mas intensa en cada membrana. Cada barra muestra el valor medio y la desviación estándar de las cuatro plantas infectadas analizadas en cada caso.

El análisis por IC-RT-PCR y posterior secuenciación del fragmento amplificado de las plantas de *N. clevelandii*, *N. benthamiana* y *P. persica* infectadas mostró que la mutación múltiple CP7T/A se mantenía estable en la progenie viral (datos no mostrados).

Dado que en la sección IV.1 se había comprobado que la infección del PPV en *A. thaliana* se ve comprometida por mutaciones que afectan a SEC, la *O*-GlcNAc transferasa que modifica a la CP del PPV, se estudió el efecto de la mutación CP7T/A en este huésped. Se inocularon biolísticamente plantas de *A. thaliana* Col-0 con pICPPV-NK-lGFP silvestre y pICPPV-NK-lGFP-CP7T/A. La infectividad de los virus derivados de los dos clones cDNA fue muy similar (100% y 90% para PPV silvestre y el mutante CP7T/A, respectivamente, en dos experimentos independientes), sin embargo, la acumulación viral del mutante deficiente en *O*-GlcNAcilación de su CP fue mucho menor, especialmente a tiempos tempranos de la infección (Fig. IV.21).

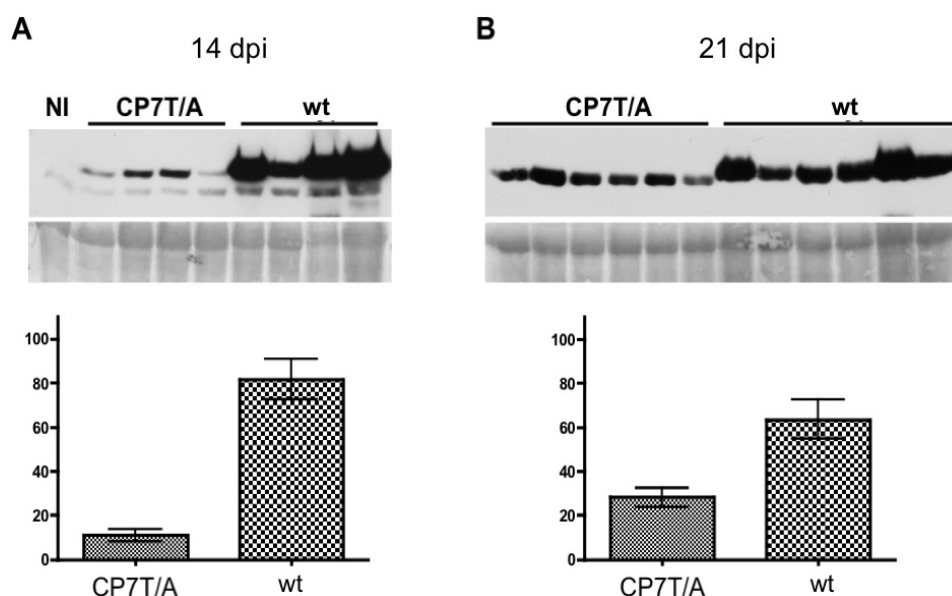


Figura IV.21. **Efecto de la *O*-GlcNAcilación de la CP en la acumulación del PPV en *A. thaliana*.** Los paneles superiores muestran el análisis de western con suero anti CP de PPV, de extractos de plantas de *A. thaliana* Col-0 infectadas con los virus indicados sobre cada grupo de carriles (wt, PPV silvestre) o de una planta no infectada (NI), recolectadas a los 14 (A) o 21 (B) dpi. Las membranas teñidas con rojo Ponceau mostrando la subunidad mayor de la proteína RuBisCO se incluyen como controles de carga. Los paneles inferiores muestran la cuantificación densitométrica de los análisis de western. Los valores son porcentajes de la densidad de la banda más intensa de cada membrana. Cada barra muestra el valor promedio y la desviación estándar de las cuatro o seis plantas infectadas analizadas en A y B, respectivamente.

Para investigar más detalladamente los defectos causados por la pérdida de la *O*-GlcNAcilación de la CP en la infección del PPV, se realizaron experimentos de competición entre PPV silvestre y el mutante CP7T/A. En ellos, se coinocularon plantas de *A. thaliana* y

N. clevelandii con mezclas de DNA de pICPPV-NK-IGFP silvestre y de pICPPV-NK-IGFP CP7T/A, este último en una cantidad ligeramente mayor. A los 22 dpi se evaluó la persistencia de los virus contendientes por IC-RT-PCR con iniciadores flanqueantes de la región mutada, seguida por digestión en sitios de restricción polimórficos. El mutante CP7T/A y el PPV silvestre continuaban coexistiendo en las plantas de *N. clevelandii* analizadas, lo cual va en concordancia con la similar eficiencia observada en las infecciones separadas (Figura IV.22A). Por el contrario, en todas las plantas coinoculadas de *A. thaliana* solo se detectó el virus silvestre, lo que confirma la eficacia biológica reducida del mutante CP7T/A (Figura IV.22B).

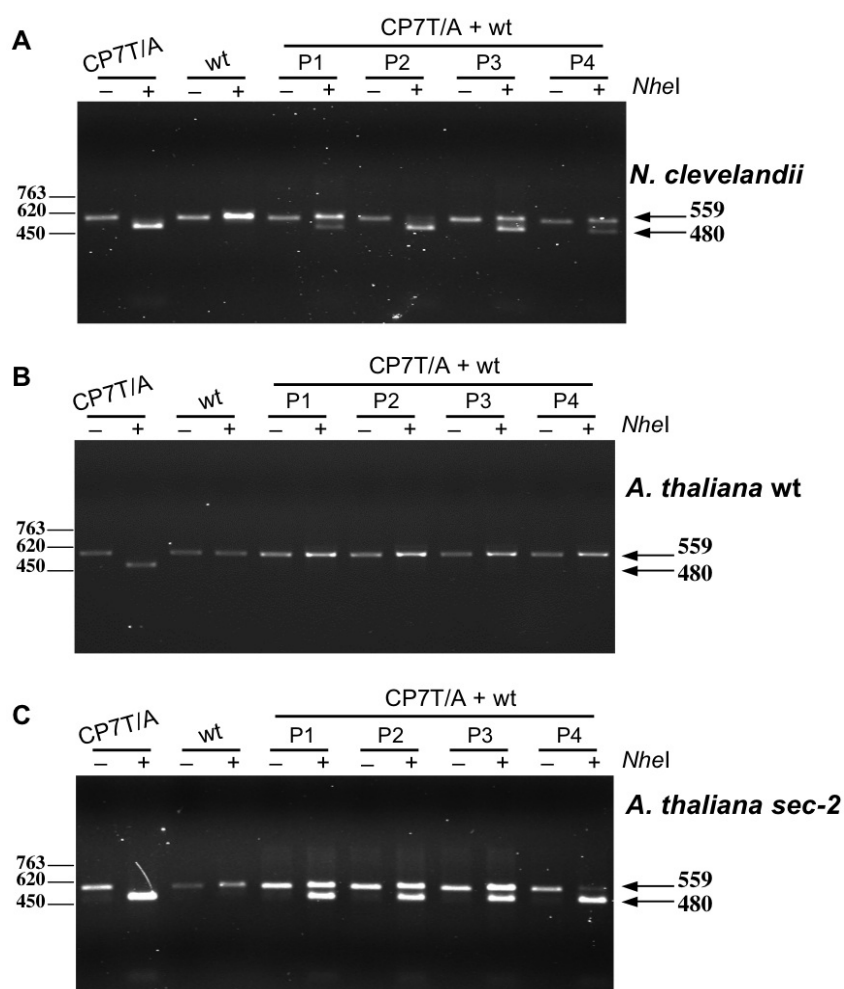


Figura IV.22. **Competición entre el PPV silvestre y el mutante CP7T/A en diferentes huéspedes.** Plantas de *N. clevelandii* (A) y *A. thaliana* Col-0 silvestre (B) o mutante *sec-2* (C) se inocularon por biolística con una mezcla 1.25:1 de DNA de pICPPV-NK-IGFP-CP7T/A y pICPPV-NK-IGFP. Se amplificaron fragmentos específicos de la secuencia codificante de la CP por IC-RT-PCR a partir de extractos de 4 plantas infectadas (P1-P4), recolectadas a los 22 dpi. La digestión con *NheI* del fragmento amplificado del virus mutante da lugar a dos trozos de 480 y 79 nt, mientras que la del fragmento del PPV silvestre (wt) lo mantiene intacto (559 nt). La posición de los fragmentos de 559 y 480 nt está señalada por flechas. Como control, se analizaron muestras de plantas inoculadas solo con PPV silvestre o con el mutante CP7T/A. A la izquierda de los paneles se muestra el tamaño de fragmentos de DNA del fago ø29 digerido con *HindIII* usados como marcadores de tamaño.

Para verificar que la reducción en la eficacia biológica del mutante CP7T/A en *Arabidopsis* se debe a la carencia de *O*-GlcNAcilación en su CP, y no a otros efectos de las siete sustituciones de Thr a Ala, se realizó un experimento de competición en plantas mutantes *sec-2*. En estas plantas, en las que tanto la CP del PPV silvestre como la del mutante CP7T/A no están *O*-GlcNAciladas, ambos virus seguían coexistiendo a los 22 dpi (Figura IV.22C), lo que sugiere que la sustitución de siete treoninas por alaninas en la CP del PPV no produce per se un efecto nocivo apreciable en *A. thaliana*.

IV.4.2. La pérdida de la *O*-GlcNAcilación incrementa la sensibilidad a proteasas de la CP del PPV

El deterioro de la infección del PPV debido a mutaciones que bloquean la *O*-GlcNAcilación de su CP puede ser debido a defectos en el ensamblaje o en la estabilidad de los viriones. Por tanto, se ensayó la susceptibilidad de la CP a la degradación proteolítica. Se

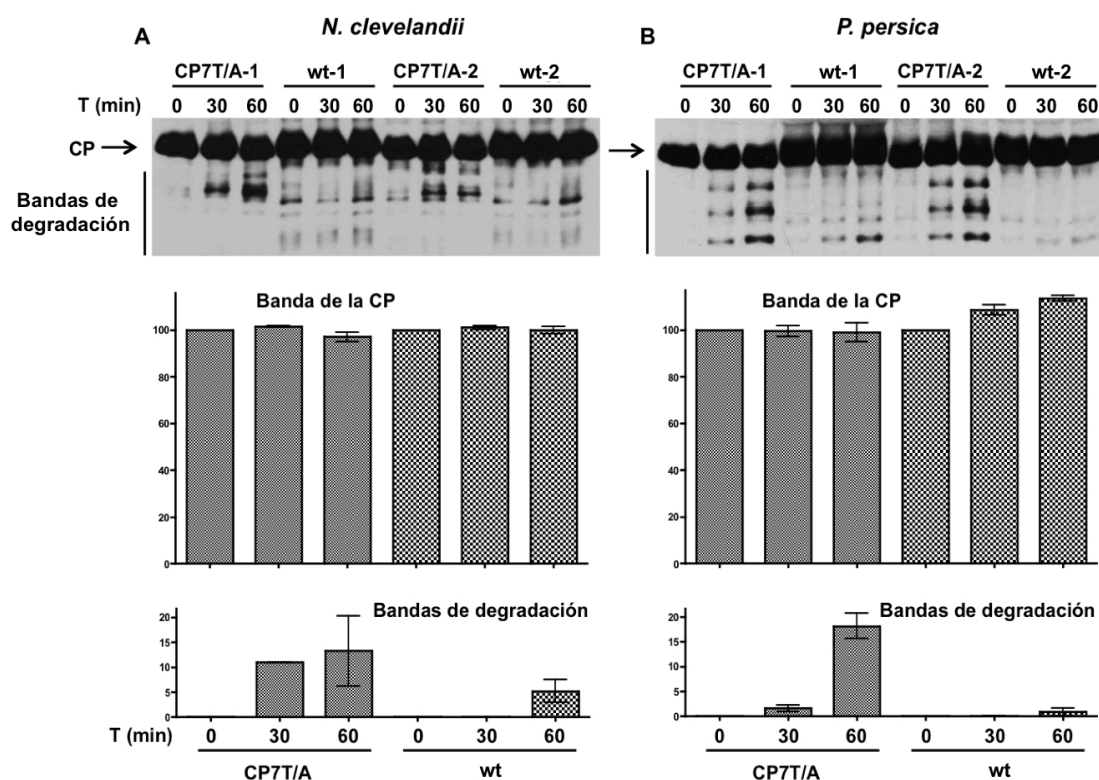


Figura IV.23. Efecto de la *O*-GlcNAcilación en la estabilidad de la CP en extractos de *N. clelandii* y *P. persica* infectados con el PPV. Dos grupos de extractos de tres plantas de *N. clelandii* (A) o *P. persica* (B) inoculadas biolísticamente con PPV silvestre o CP7T/A y recolectadas a los 21 dpi, se incubaron a temperatura ambiente por los tiempos indicados, y se sometieron a análisis de western con suero anti CP de PPV (paneles superiores). La cuantificación densitométrica de las señales correspondientes a la CP intacta y a sus productos de degradación se muestran en los paneles inferiores. Los valores son porcentaje de la densidad de la banda de la CP de cada grupo de plantas al tiempo 0. Cada barra muestra el valor promedio y la desviación estándar de los dos grupos de plantas analizados para cada virus.

prepararon extractos de diferentes plantas infectadas con PPV silvestre o con el mutante CP7T/A, y se analizó la abundancia e integridad de la CP después de diferentes tiempos de incubación a temperatura ambiente (~24°C). Tanto la CP silvestre como la CP7T/A se mostraron muy estables en los extractos de *N. clevelandii* y *P. persica*, sin embargo, se detectaron algunos productos de degradación que eran algo más abundantes en las muestras CP7T/A (Figura IV.23). El efecto de la falta de *O*-GlcNAcilación fue mucho más acusado en los extractos de *A. thaliana*. En este huésped, mientras la CP silvestre fue igualmente muy estable en los extractos, menos del 30% de la CP CP7T/A permaneció intacta después de 60 minutos de incubación (Figura IV.24A).

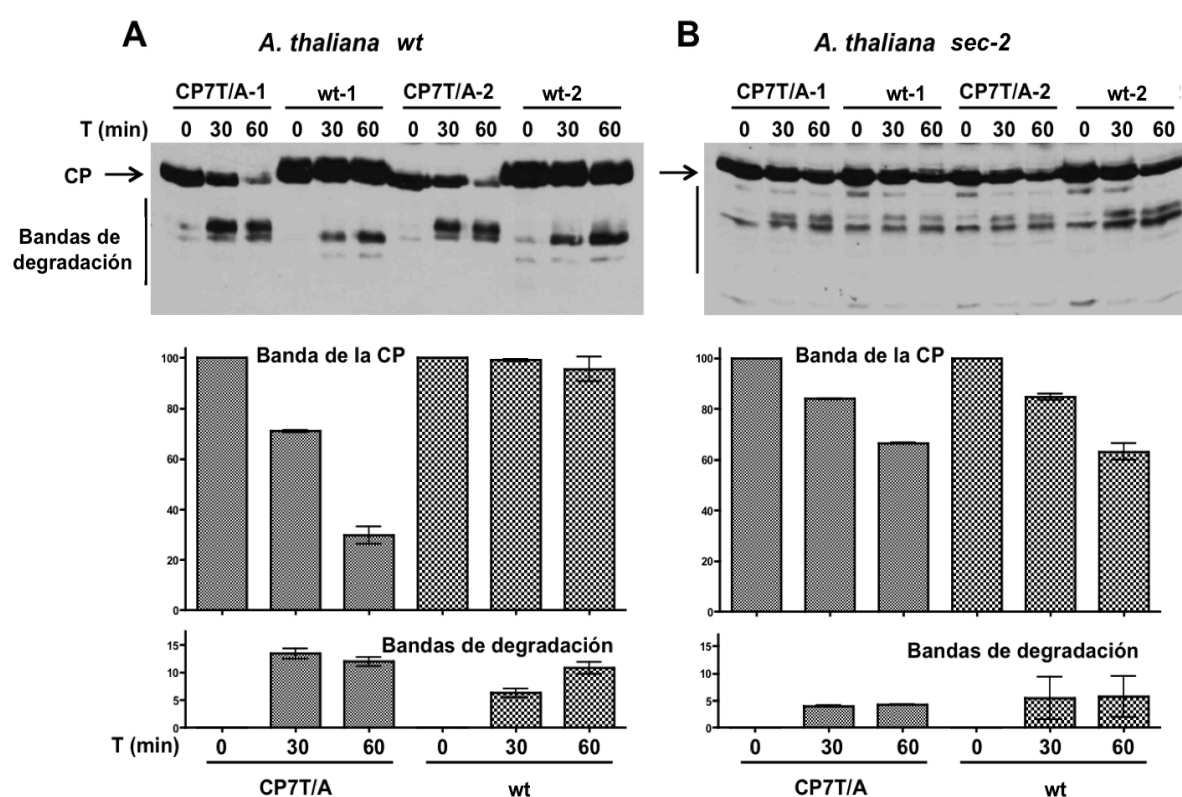


Figura IV.24. Efecto de la *O*-GlcNAcilación en la estabilidad de la CP en extractos de plantas de *A. thaliana* infectadas con el PPV. Dos grupos de extractos de tres plantas de *A. thaliana* Col-0 silvestre (wt) (A) o *sec-2* (B) inoculadas biolísticamente con el PPV silvestre o con el PPV-CP7T/A, y recolectadas a los 21 dpi se incubaron a temperatura ambiente por los tiempos indicados en cada caso y se sometieron a análisis de western con suero anti CP de PPV (paneles superiores). La cuantificación densitométrica de las señales correspondientes a la CP intacta y a sus productos de degradación se muestran en los paneles inferiores. Los valores son porcentajes de la densidad de la banda de la CP de cada grupo de plantas a tiempo 0. Cada barra muestra el valor promedio y la desviación estándar de los dos grupos de plantas analizado para cada virus.

Con el fin de diferenciar entre los efectos debidos a la abolición de la *O*-GlcNAcilación y otros posibles defectos causados por la mutación CP7T/A, se estudió la

estabilidad de la CP en extractos de tejido infectado del mutante *sec-2* de *A. thaliana*. En estos extractos, las degradaciones de la CP silvestre y de la CP con la mutación CP7T/A fueron similares (Fig. IV.24B), lo que indica que en una planta incapaz de modificar por *O*-GlcNAcilación a la CP del PPV, las sustituciones de treonina por alanina del mutante CP7T/A no tienen un efecto notable en la estabilidad de la proteína. Sorprendentemente, la inestabilidad de la CP del PPV (silvestre o CP7T/A) causada por la mutación *sec* en la planta infectada fue menos marcada que la causada por la mutación CP7T/A del virus en las plantas silvestres (Fig. IV.24B). Esto sugiere que la mutación *sec* podría producir efectos estabilizadores adicionales que compensaran parcialmente los efectos desestabilizadores de la CP debidos a la carencia de su *O*-GlcNAcilación.

IV.5. EFECTOS DEL SILENCIAMIENTO DE SEC SOBRE LA INFECCIÓN DE PPV EN *Nicotiana benthamiana*

Dado que el efecto de eliminar las dianas de *O*-GlcNAcilación en la CP parecía ser distinto en diferentes huéspedes, se decidió apagar la expresión de SEC mediante silenciamiento de RNA en plantas transgénicas de *N. benthamiana* para comparar el efecto de la deficiencia de SEC sobre la infección del PPV en plantas diferentes a *Arabidopsis*.

Alineando la secuencia de *SEC* de *A. thaliana* con las de otras OGTs que estaban disponibles en las bases de datos cuando se comenzó este trabajo, se encontró una región altamente conservada codificada por la secuencia comprendida entre las posiciones 2172 y 2532 de la secuencia codificante de *SEC* de *Arabidopsis*. Se prepararon cebadores degenerados que permitieron amplificar por RT-PCR y clonar la región correspondiente de los genes *SEC* de *N. clevelandii*, *N. benthamiana*, *N. tabacum*, *A. thaliana* y *P. persica*. De las plantas de *Nicotiana* se obtuvieron varios clones que se diferenciaban en un pequeño número de nucleótidos y podrían corresponder a tres genes diferentes (Fig. IV.25). Los clones b3, b4 y bB3 de *N. benthamiana* y cC4 de *N. clevelandii* mostraban niveles de similitud de 96-97 %, mientras que la similitud de los clones bB2 de *N. benthamiana*, cC2, cCa, cCb y cCe de *N. clevelandii*, y el único de *N. tabacum* que se analizó estaba entre 96 y 99 % (Fig. IV.25 y Tabla IV.3). El clon b2 de *N. benthamiana* era más o menos igual de similar a los dos grupos de clones (89-92 %) y (90-94 %). El nivel de similitud de los genes *SEC* de *Nicotiana* con los de *A. thaliana* y *P. persica* era de alrededor del 80% (Tabla IV.3).

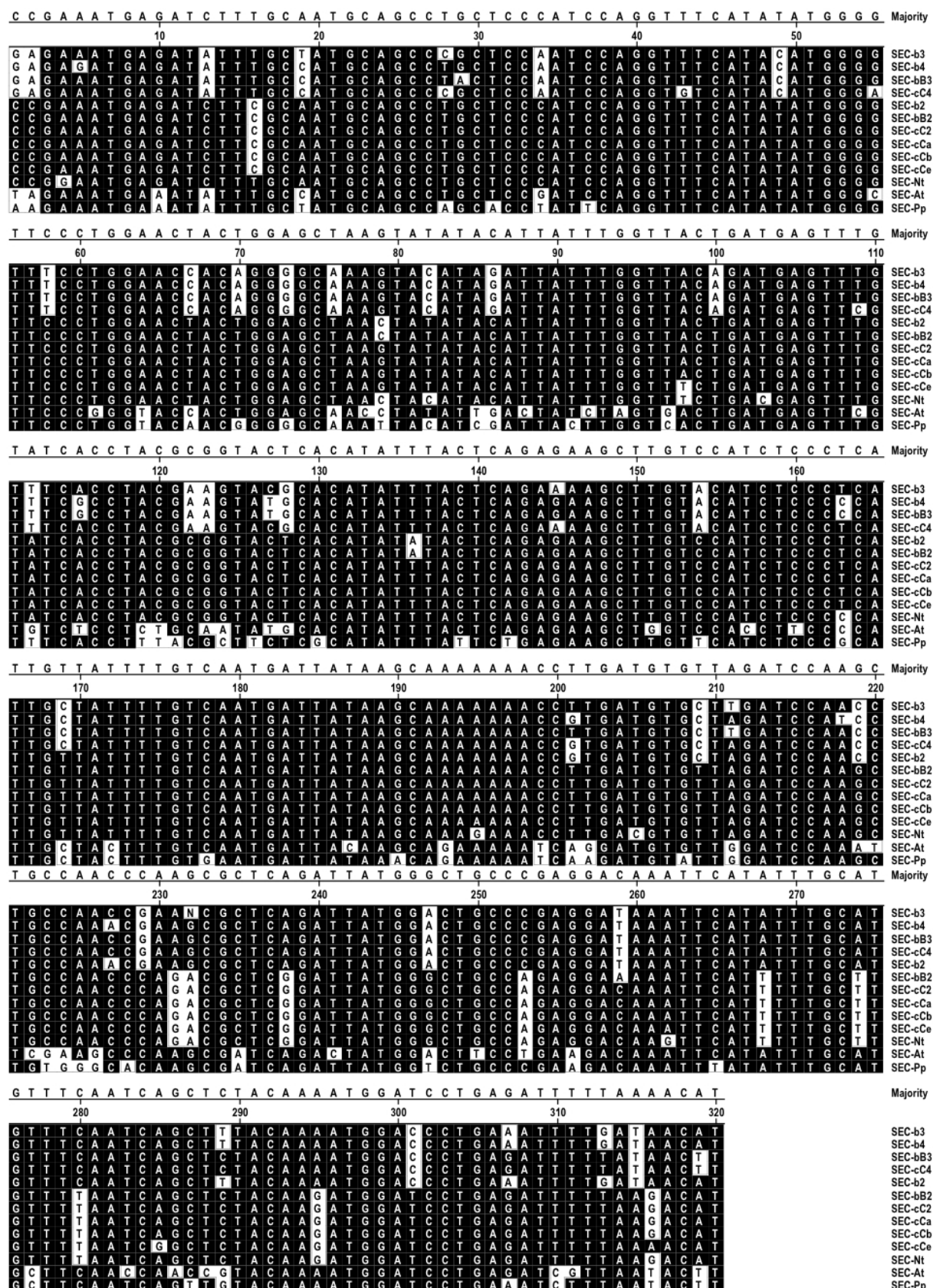


Figura IV.25. Comparación de secuencias de SEC clonadas de diferentes plantas. Se comparan las secuencias de cinco clones de *N. benthamiana* (SEC-b2, SEC-b3, SEC-b4, SEC-bB2 y SEC-bB3), cinco clones de *N. clelandii* (SEC-c2, SEC-c4, SEC-cCa, SEC-cCb y SEC-cCe) y un clon de *N. tabacum* (SEC-Nt), *A. thaliana* (SEC-At), y *P. persica* (SEC-Pp) correspondientes la región comprendida entre los nt 2192 y 2512 de la secuencia codificante de la proteína SEC de *A. thaliana*.

Tabla IV.3 Similitud (%) entre secuencias de SEC clonadas de diferentes plantas

	Nb ¹			Nc ¹	Nb ¹		Nc ¹				Nt ¹	At ¹	Pp ¹
	b3	b4	bB3	cC4	b2	bB2	cC2	cCa	cCb	cCe			
b3	-	96.2	96.2	96.2	90.2	85.9	86.6	86.6	86.6	86.2	84.7	78.1	80.6
b2	90.9	91.2	89.4	89.7	-	93.4	92.8	92.8	92.8	92.5	90.3	78.4	79.4
bB2	85.9	84.7	85.9	85.6	93.4	-	99.1	99.1	99.1	98.1	96.6	78.1	78.8

Se comparan las secuencias correspondientes a la región comprendida entre los nt 2192 y 2512 de la secuencia codificante de la proteína SEC de *A. thaliana*

¹ Nb, *N. benthamiana*; Nc, *N. clevelandii*; Nt, *N. tabacum*; At, *A. thaliana*; Pp, *P. persica*

IV.5.1. Obtención de plantas transgénicas de *N. benthamiana* silenciadas constitutivamente en los genes *SEC-b2* y *SEC-b3*.

Los fragmentos clonados de *SEC-b2* y *SEC-b3* se introdujeron en el vector pCAMBIA1300, en sentido y antisentido (repetición invertida, o IR) separados por un intrón, con la capacidad de formar una estructura en horquilla (Fig. IV.26). Las construcciones hechas, pCAMBIA1300-SEC-b2 y pCAMBIA1300-SEC-b3, se transfirieron a *A. tumefaciens*, y con las cepas resultantes se transformaron plantas de *N. benthamiana*, con el objeto de suprimir la expresión de SEC por silenciamiento de RNA (Waterhouse y col., 1998).

Se obtuvieron 27 y 33 líneas transgénicas de *SEC-b2* y *SEC-b3*, respectivamente, a partir de los cuales se podía amplificar por PCR un fragmento de 515 pb correspondiente a la secuencia de *SEC* de una de las ramas de la horquilla, además del intrón (datos no mostrados). Se eligieron 10 líneas SEC-b2 y 8 SEC-b3 para su análisis posterior. El posible silenciamiento génico de *SEC* se analizó, por medio de ensayos de tipo Northern, en las plantas derivadas de la autofecundación de las plantas regeneradas inicialmente (generación F1). En 14 líneas (6 SEC-b2 y 8 SEC-b3) se obtuvo un silenciamiento muy acusado (Fig. IV.27), mientras que en las 4 (3 SEC-b2 y 1 SEC-b3) los niveles de mRNA de SEC eran similares a los de las plantas silvestres (Fig. II.27A y B). El fenotipo se mantuvo en la mayoría de las plantas analizadas de la siguiente generación, procedentes de la autofecundación de plantas F1 homocigotas con una sola copia del transgén (Fig. IV.27C y D). Sin embargo se observaron excepciones como la planta SEC-b2-31-1-3, que a diferencia de su madre (SEC-b2-31-1) y su hermana (SEC-b2-31-1-1) expresaban niveles relativamente altos de mRNA de SEC (aunque menores que los de las plantas silvestres) (Fig. IV.27A y C); igualmente, la planta SEC-b2-5-1-1 parecían haber

perdido el silenciamiento de SEC que mostraba la descendencia de su progenitora SEC-b2-5-1 (Fig. IV.27A y C).

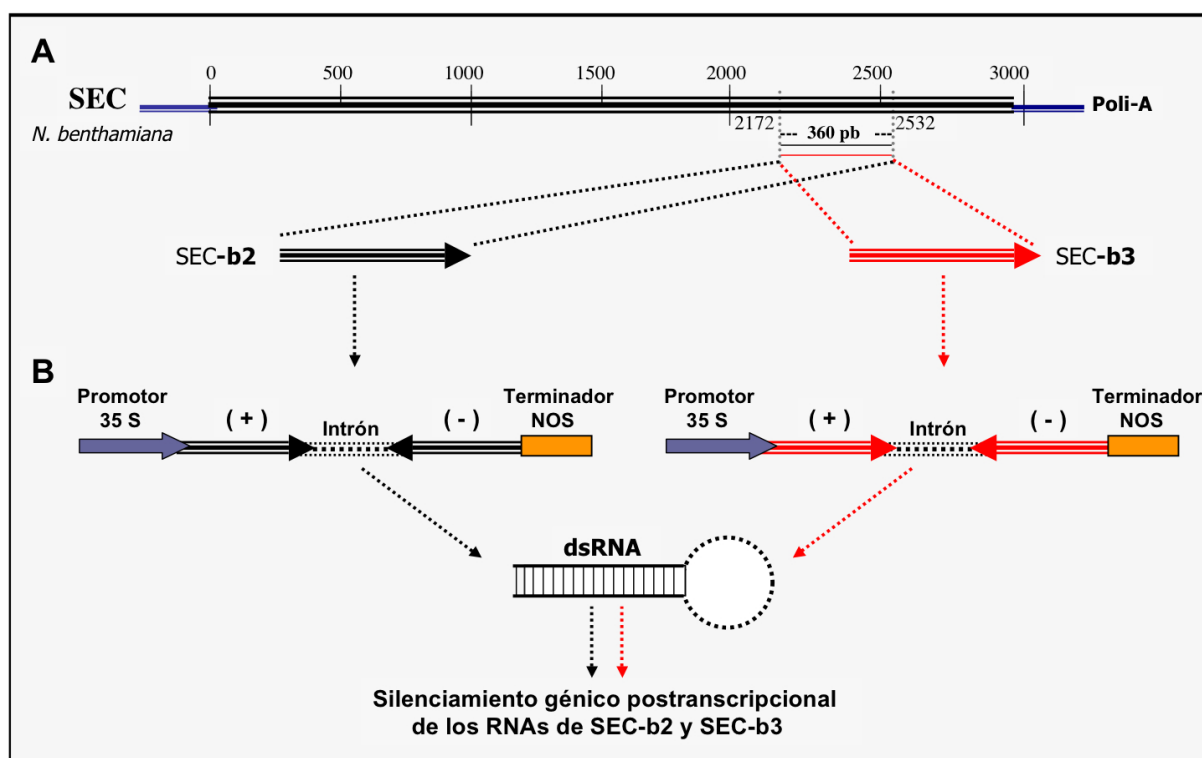


Figura IV.26. Silenciamiento de SEC en plantas transgénicas de *N. benthamiana*. A) Representación esquemática del mRNA de SEC-b2 y SEC-b3 donde se muestra la región clonada en forma de repeticiones invertidas. B) Estrategia seguida para silenciar la expresión de SEC-b2 y SEC-b3 a través de la formación de RNAs de doble cadena de la secuencia de los genes diana. (+), RNA en sentido. (-), RNA en antisentido.

IV.5.2. Efecto sobre la acumulación viral del PPV del silenciamiento de SEC en plantas de *N. benthamiana* que expresan IRs de SEC-b2 y SEC-b3

Para analizar el efecto del silenciamiento de SEC sobre la infección del PPV en *N. benthamiana* se eligieron dos plantas transgénicas SEC-b2 (4-1-1 y 52-1-2) y dos SEC-b3 (11-1-2, 49-1-1) de la generación F2 que habían mostrado una supresión de la expresión de SEC acusada y estable (Fig. IV.26). Se inocularon plantas descendientes de su autofecundación con PPV-NK-IGFP. La monitorización de la fluorescencia de la GFP no mostró diferencias apreciables en el crecimiento de los focos de infección de las hojas inoculadas entre las plantas con SEC silenciada y las silvestres (datos no mostrados). Sin embargo un análisis de Western a los 10 dpi parecía mostrar niveles de acumulación sistémica viral algo menor en las plantas de las dos líneas silenciadas (Fig. IV.28A). Para verificar esta

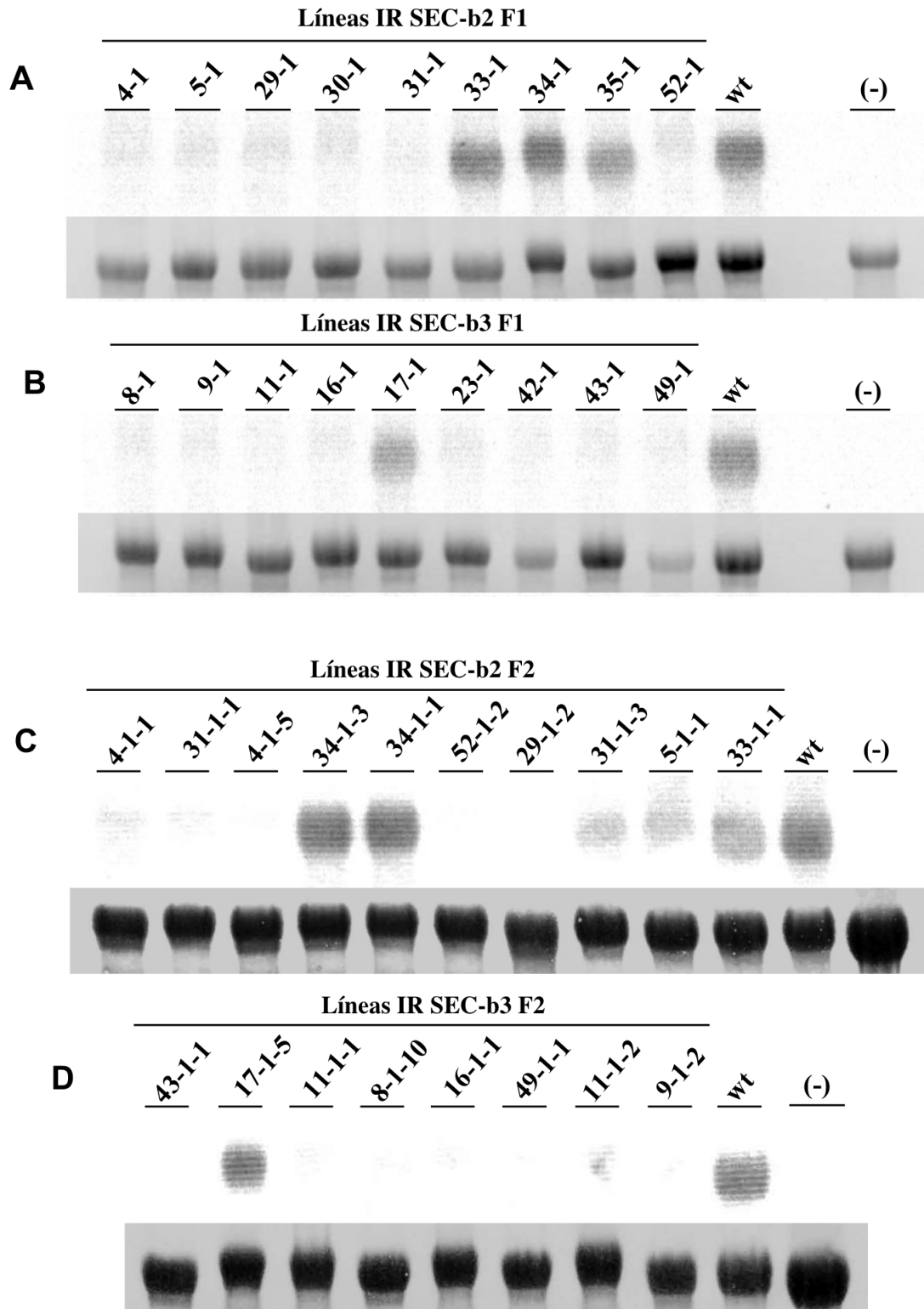


Figura IV.27. **Análisis del silenciamiento de los genes *SEC* en diferentes líneas transgénicas.** La acumulación de mRNA de *SEC* en plantas de *N. benthamiana* transformadas con IR de *SEC-b2* (A y C) y *SEC-b3* (B y D) se analizó por Northern con una sonda específica de *SEC-b2* (nt 2533 a 3174, 87 % de similitud con *SEC-b3*). Se analizaron plantas de la generación F1 (A y B) y de la generación F2 descendientes de ellas (C y D). Las muestras corresponden a hojas maduras y se tomaron a los 35 días después del trasplante a tierra. Como control de carga se muestra el rRNA 28S teñido con azul de metileno (paneles inferiores). wt, muestra de RNA de plantas silvestres de *N. benthamiana*. (-), RNA de plantas de *A. thaliana* con la mutación *sec-2*, usadas como control negativo de la expresión de *SEC*.

apreciación se inocularon nuevamente plantas descendientes de SEC-b2-4-1-1 y se analizó la acumulación sistémica viral a un tiempo más temprano (8 dpi). El análisis de western mostró una clara reducción de aproximadamente un 75% en la acumulación de virus en las plantas SEC-b2-4-1-1 con respecto a la detectada en las plantas silvestres (Fig. IV.28B y D). Las diferencias disminuían drásticamente con el progreso de la infección, de manera que a los 21 dpi la acumulación de PPV en las plantas de la línea silenciada y en las plantas silvestres fue muy similar (Fig. IV.28C y E).

El hecho de que las diferencias en acumulación viral entre las plantas transformadas con las IR de *SEC-b2* y *SEC-b3* disminuyeran drásticamente a tiempos tardíos de la infección

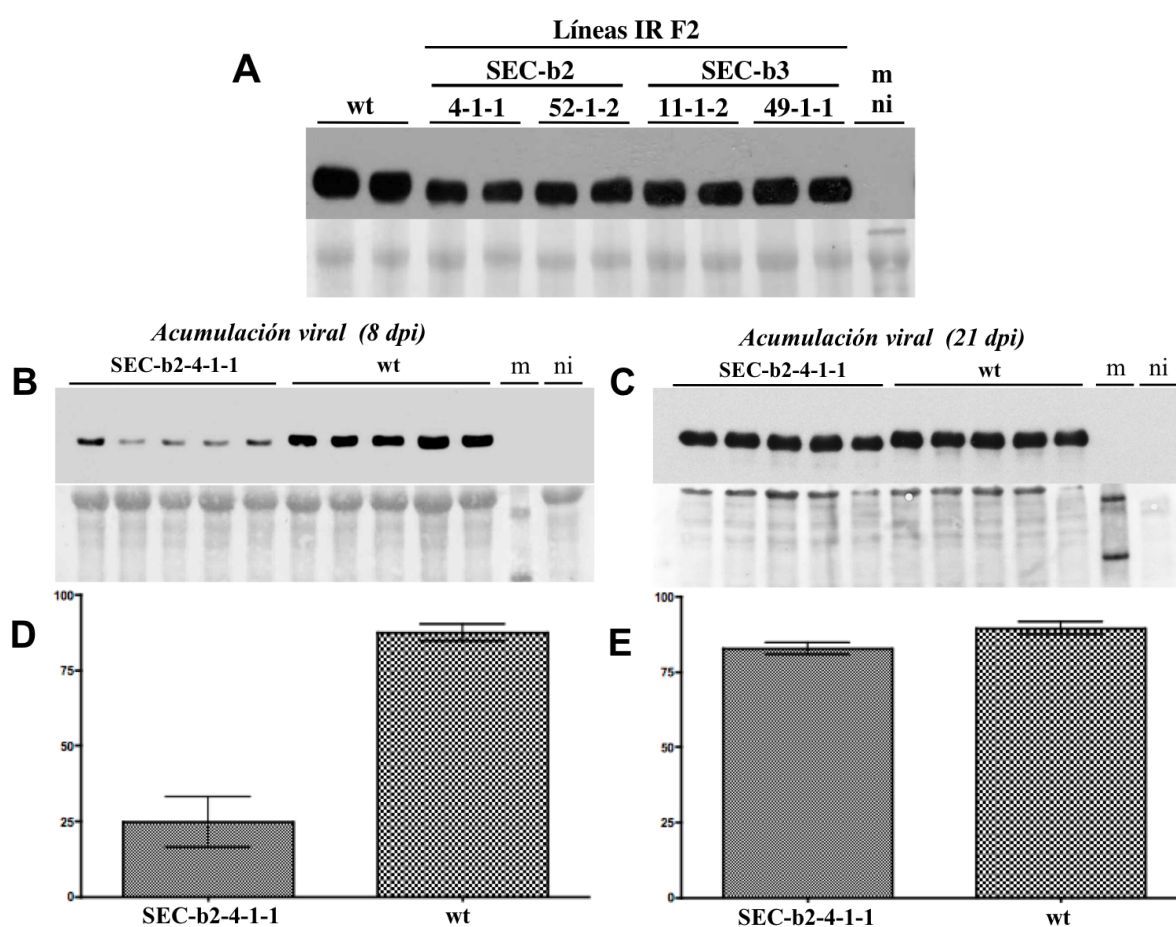


Figura IV.28. **Acumulación viral de PPV en plantas con SEC silenciada.** A-C) Análisis de western con suero anti CP de extractos de plantas descendientes de las plantas transgénicas indicadas y de plantas silvestres (wt) inoculadas con PPV-NK-IGFP. En A se muestra el análisis western blot de las hojas infectadas sistémicamente a 10 dpi. Cada carril corresponde a un grupo de 2 plantas. En B se muestra el análisis de hojas jóvenes recogidas a 8 dpi (izquierda) y en C al análisis de hojas jóvenes recogidas a 21 dpi. Cada carril corresponde a una planta individual. Los carriles ni corresponden a plantas silvestres de *N. benthamiana* no infectadas. Las membranas teñidas con rojo Ponceau mostrando la subunidad mayor de la proteína RuBisCO se incluyen como control de carga. Los carriles m muestran marcadores de masa molecular de 47.5 y 32.5 kDa preteñidos (New England Biolabs). En D y E se muestra la cuantificación densitométrica de las acumulaciones virales determinadas por los análisis de western mostrados en B y C, y por los duplicados no mostrados. Los valores son porcentajes de la densidad de la banda más intensa de cada membrana. Cada barra muestra el valor promedio y la desviación estándar de 10 plantas.

sugería que la infección viral, que produce al potente supresor de silenciamiento HCPro podría estar reactivando a SEC en las plantas inicialmente silenciadas. Sin embargo, en plantas de diferentes líneas transgénicas recogidas a 18 dpi, cuando su acumulación viral es similar a la de plantas infectadas silvestres o descendientes de la planta SEC-b3-17-1-5, no silenciada, (Fig. IV.29A), se mantenía el silenciamiento eficiente de SEC (Fig. IV.29B).

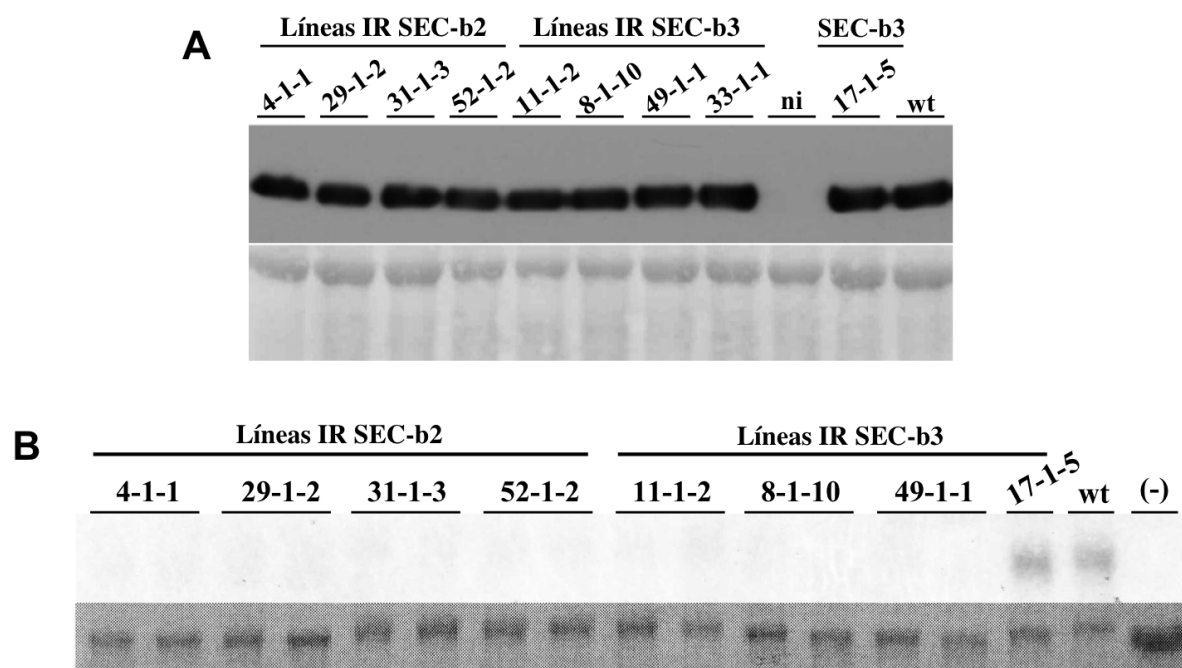


Figura IV.29. Silenciamiento de SEC en plantas de líneas transgénicas infectadas con el PPV. Análisis de western con suero anti CP (A) y de Northern con una sonda específica de *SEC-b2* (nt 2533 a 3174, 86% de similitud con *SEC-b3*) de extractos de plantas descendientes de las plantas transgénicas indicadas, y de plantas silvestres (wt) inoculadas con PPV-NK-IGFP. Las muestras corresponden a hojas maduras y se tomaron a los 18 dpi de plantas inoculadas 35 dpi después del trasplante a tierra. Cada carril de A y B corresponde a grupos de 2 y de 5 plantas, respectivamente. Las membranas teñidas con rojo Ponceau, mostrando la subunidad mayor de la proteína RuBisCO (A) y con azul de metileno mostrando el rRNA 28S (B) se incluyen como control de carga. ni, planta silvestre no infectada; (-), RNA de plantas de *A. thaliana* con la mutación *sec-2*, usadas como control negativo de la expresión de SEC.

IV.5.3. Efecto sobre la *O*-GlcNAcilación de la CP del PPV del silenciamiento de SEC en plantas de *N. benthamiana* que expresan IRs de *SEC-b2* y *SEC-b3*.

Para determinar la *O*-GlcNAcilación de la CP del PPV en *N. benthamiana* deficiente en SEC, se purificaron viriones a partir del tejido infectado de plantas descendientes de SEC-b2-4-1-1, SEC-b2-52-1-2, SEC-b-49-1-1 y SEC-b3-17-1-5, se digirieron con tripsina y se analizaron por MALDI-TOF. El espectro de los viriones acumulados en las plantas de la línea SEC-b3-17-1-5, cuya expresión de SEC seguía activa, mostraba el mismo patrón de *O*-

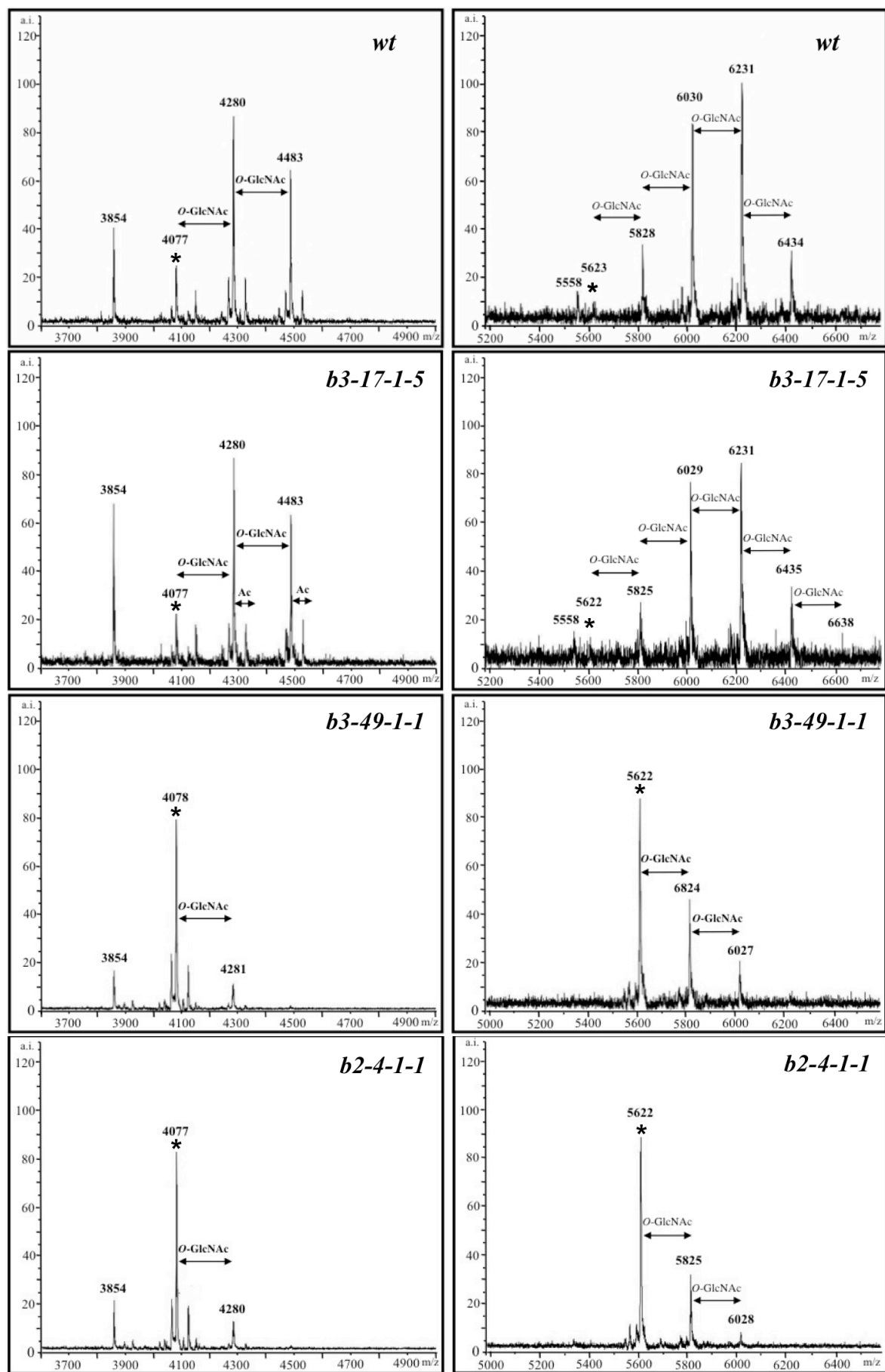


Figura IV.30 **Análisis por MALDI-TOF de viriones de PPV purificados de plantas de *N. benthamiana* transformadas con IRs de *SEC-b2* y *SEC-b3*.** Espectros correspondientes a los péptidos 1-39 (paneles izquierdos) y 40-93 (paneles derechos) de viriones purificados a partir de grupos de 10 plantas descendientes de las plantas transgénicas indicadas y de plantas silvestres (wt), infectadas con PPV-NK-IGFP. Las muestras se recogieron a los 18 dpi, y sus análisis de acumulación viral por Western y de expresión de SEC por Northern se muestran en la Fig. IV.29. Se indica la relación masa/carga (m/z en Daltones) asignada a los picos más relevantes. Los asteriscos señalan a los picos correspondientes a los péptidos 1-39 y 40-93 sin glicosilar. O-GlcNAc, O-GlcNAcilación; a.i., valores de intensidad arbitrarios.

GlcNAcilación de la CP observado en los viriones de las plantas silvestres (Fig. IV.30). Por el contrario, las muestras de viriones purificados a partir de plantas con SEC silenciada (*SEC-b2-4-1-1*, *SEC-b2-52-1-2* y *SEC-b3-49-1-1*) mostraron patrones claramente alterados. No se detectaba la forma di-O-GlcNAcilada del péptido 1-39 y el nivel de la forma mono-O-GlcNAcilada de este péptido era muy inferior al observado en los espectros de viriones producidos por plantas con el SEC sin silenciar (Fig. IV.30). Asimismo, en los espectros de los viriones de plantas con SEC silenciada se apreciaba la desaparición de las formas tetra- y tri-O-GlcNAciladas del péptido 40-93, y una drástica disminución de sus formas di- y mono-O-GlcNAcilada. Así pues, los péptidos 1-39 y 40-93 de la CP se encontraban en los viriones producidos en plantas con SEC silenciada mayoritariamente sin O-GlcNAcilar (Fig. IV.30).

Todos estos resultados sugieren que la supresión parcial de la expresión de SEC causa en *N. benthamiana* un retraso de la infección por el PPV similar al causado por la desaparición total de O-GlcNAcilación en mutantes *sec* de *Arabidopsis*.

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

V.1. IDENTIFICACIÓN DE LA ENZIMA OGT IMPLICADA EN LA *O*-GlcNAcilACIÓN DE LA CP DEL PPV

Dentro de la sofisticada red de mecanismos que regulan la expresión génica y las funciones de los productos génicos, se encuentran el gran número de modificaciones químicas que sufren las proteínas después de su síntesis. Estas modificaciones postraduccionales juegan papeles muy importantes, y entre ellas, una de las modificaciones más complejas, variables y ampliamente distribuidas es la glicosilación (Spiro, 2002). Mientras que la modificación más común por carbohidratos es la unión de oligosacáridos complejos a residuos de asparagina en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, la *O*-GlcNAcilación es mucho más simple - consiste en la adición de monosacáridos de β -N-acetilglucosamina (GlcNAc) a serinas y treoninas de proteínas nucleares y citoplásmicas (Hart y col., 2011)- pero no por ello menos importante, como se refleja en el hecho de que la enzima que la causa (OGT) es esencial en la mayoría de los metazoos (Shafi y col., 2000) y en las plantas (Hartweck y col., 2002).

Mientras que la identificación de proteínas de mamíferos *O*-GlcNAciladas y de sus residuos *O*-GlcNAcilados, así como la caracterización de la relevancia funcional de las modificaciones ha crecido rápidamente durante las últimas tres décadas, la información equivalente en plantas es todavía muy limitada (Hart y col., 2011; Olszewski y col., 2010; Wang y col., 2011). El análisis filogenético de las proteínas tipo OGT, permite su clasificación en dos grupos bien diferenciados, que parecen derivar de una antigua duplicación génica que tuvo lugar en el mundo procariota (Olszewski y col., 2010). A diferencia de los animales, que solo tienen una OGT, las plantas tienen dos OGTs, SEC, que pertenece al mismo grupo que las OGTs de animales, y SPY, que es miembro del segundo grupo. Se ha sugerido que las OGTs de tipo SPY se introdujeron en los eucariotas vía el endosimbionte que dio lugar al cloroplasto (Olszewski y col., 2010). SEC y SPY parecen tener funciones parcialmente solapantes. La pérdida de función de cualquiera de las dos OGTs, SEC o SPY, no causa letalidad por sí sola. Sin embargo, los embriones con la doble mutación *sec/spy* mueren antes de que se complete el desarrollo de la semilla (Hartweck y col., 2002). Aunque la explicación más plausible de este hecho es que SEC y SPY son capaces de desempeñar indistintamente una o varias funciones esenciales para la embriogénesis, también es posible que SEC y SPY participen en procesos independientes y

que solo se produzca letalidad del embrión cuando ambos procesos se ven alterados (Olszewski y col., 2010).

El grado de solapamiento entre las funciones de SPY y SEC es desconocido. De hecho es muy poco lo que se sabe sobre proteínas de plantas que son dianas de *O*-GlcNAcilación. Hay evidencia sólida de que la proteína floemática CmPP16-1 está *O*-GlcNAcilada y de que su modificación es importante para su capacidad de interaccionar con la proteína Nt-NCAPP1 - que también parece estar *O*-GlcNAcilada – y de moverse a través de los plasmodesmos (Taoka y col., 2007). A pesar de que se ha identificado a una serina particular como la posible diana de la *O*-GlcNAcilación, no hay datos sobre la estructura precisa de la rama glucosídica que se incorpora a la proteína. Otra proteína que se ha visto que contiene residuos de *O*-GlcNAc es la proteína gp40 (Heese-Peck y col., 1995; Heese-Peck y Raikhel, 1998), que forma parte del complejo del poro nuclear, y que es un homólogo cercano de Nt-NCAPP1. No se sabe si estas modificaciones las realizan OGTs del tipo SEC o SPY, pero el hecho de que la modificación de gp40 es más compleja que la adición de un único residuo de *O*-GlcNAc, sugiere que la glicosilación de estas proteínas podría diferir considerablemente de la que causan las OGTs de animales.

El hecho de que no se hayan encontrados nulos de *SPY* (Silverstone y col., 2007) y de que los defectos de mutantes de pérdida de función de este gen sean mucho más graves que los de mutantes nulos de *SEC* (Olszewski y col., 2010) podría explicarse si existe una coincidencia en los sustratos utilizados por SPY y SEC pero SPY es responsable de la mayor parte de la *O*-GlcNAcilación, o bien algunos sustratos importantes de SPY no pueden ser modificados por SEC. Sin embargo, los resultados de esta tesis lo que muestran es que la CP del PPV es sustrato de SEC, pero no de SPY. Esto se aprecia sin ambigüedad para las dianas Thr19 y Thr 24, que se muestran intactas en los dos mutantes *sec* analizados (Fig. IV.5). Aunque no se puede descartar formalmente la posibilidad de que OGTs de tipo SPY glicosilen alguno de los residuos del péptido 40-93, el hecho de que la *O*-GlcNAcilación parezca decaer de manera similar en los péptidos 1-39 y 40-93 en las plantas de *N. benthamiana* con SEC silenciada por RNAi (Fig. IV.30), sugiere fuertemente que todas las dianas de *O*-GlcNAcilación son modificadas por el mismo tipo de OGT. Hay que destacar aquí que los resultados de clonación y secuenciación sugieren que *N. benthamiana* puede tener dos genes de SEC homólogos muy similares (Fig. IV.25), probablemente como consecuencia de su naturaleza anfidiplóide (Goodin y col., 2008). Tanto los análisis de MALDI-TOF de los mutantes T19A, T24A y TT19,24AA, como los de espectrometría ETD MS/MS del virus silvestre muestran que la CP del PPV está modificada por residuos simples

de *O*-GlcNAc, como las proteínas *O*-GlcNAcizadas de mamíferos por su OGT tipo SEC, y en contraste con la aparente complejidad de la *O*-GlcNAcización de la proteína gp40 de tabaco. Esta diferencia podría sugerir que las dos proteínas expresadas en plantas podrían estar modificadas por OGTs diferentes. En cualquier caso, queda por averiguar si la *O*-GlcNAcización causada por SPY difiere o no de la causada por las OGTs tipo SEC de plantas y animales.

V.2. IDENTIFICACIÓN DE DIANAS DE *O*-GlcNAcización EN LA CP DEL PPV

La desaparición de la forma di-glicosilada del péptido 1-39 en el espectro de MALDI-TOF de los viriones de los mutantes T19A y T24A (Fig. IV.8) y de las formas mono y diglicosilada de este péptido en el de los viriones del doble mutante TT19,24AA (Fig. IV.9) es una clara indicación de que las treoninas Thr-19 y Thr-24 son dos de las dianas de *O*-GlcNAcización de la CP del PPV. En el mutante MG todas las serinas y treoninas de los primeros 43 aa de la CP han sido reemplazadas por alaninas. La detección de tres formas *O*-GlcNAcizadas del péptido 40-93 en espectro de MALDI-TOF de viriones de este mutante, en lugar de las cuatro que se detectan en el espectro de viriones del PPV silvestre (Fig. IV.14) demuestra que hay tres dianas de *O*-GlcNAcización entre las treoninas 50 y 91, y sugiere fuertemente que uno de los tres residuos Thr-40, Thr-41 o Ser-43 está *O*-GlcNAcizado. El hecho de que la restauración de Thr-41 en el mutante MG, pero no las de Thr-40 o Ser-43, de lugar a la recuperación del cuarto pico de glicosilación (Fig. IV.14) apoya la suposición de que Thr-41 es el sitio de *O*-GlcNAcización. Sin embargo no es posible descartar formalmente la posibilidad de que la mutación T41A altere la estructura de la proteína y perturbe la *O*-GlcNAcización en otra posición.

Las mutaciones a Ala de Thr-71, Thr-74 y Thr-91 no cambiaban el patrón de *O*-GlcNAcización del péptido 40-93 (Fig. IV.17), lo que demuestra que estas treoninas no están modificadas. En cambio, las mutaciones de las treoninas localizadas entre las posiciones 50 y 58 sí que afectan a la *O*-GlcNAcización de la CP del PPV (Fig. IV.17). Estos datos no permiten discriminar si estas treoninas están ellas mismas *O*-GlcNAcizadas o si son importantes para la modificación de residuos vecinos (Fig. IV.17). Por el contrario, el análisis de ETD MS/MS identifica directamente los residuos modificados en la CP del virus silvestre. Este análisis verificó que las treoninas 19, 24, 41, 53 y 54 y/o 58 llevan unidos residuos *O*-GlcNAc (Tabla IV.2), lo que está de acuerdo con los resultados de la mutagénesis. Además, se observó que la serina 65, que no se incluyó en el programa de mutagénesis, también estaba

O-GlcNAcilada en los viriones del PPV silvestre (Fig. IV.18 y Tabla IV.2). Puesto que el análisis de ETD detectaba hasta cinco residuos *O*-GlcNAc en el péptido 40-93, dos aminoácidos, además de T41, T53 y S65 pueden estar *O*-GlcNAcilados. Teniendo en cuenta los resultados del estudio de mutagénesis, lo más probable es que tanto Thr-54 como Thr-58, o uno de estos dos residuos y Thr-50, estén glicosilados. Puesto que las mutaciones T50A y T53A eliminaban dos residuos *O*-GlcNAc (Fig. IV.17), algunas mutaciones Thr a Ala afectan a la *O*-GlcNAcilación de residuos adyacentes.

Los resultados mostrados en esta tesis, están de acuerdo con el análisis ETD MS/MS de la *O*-GlcNAcilación de la CP del PPV por SEC de *A. thaliana* en un sistema de expresión de *E. coli* publicado por Kim y col. (2011), que muestra la *O*-GlcNAcilación de Thr-19, Thr-24, Thr-41, Thr-53 y Ser 65. La coincidencia de 5 sitios de glicosilación en la CP del PPV expresada en plantas infectadas y en *E. coli* apoya fuertemente la sugerencia propuesta en el citado artículo de que la especificidad del reconocimiento por SEC de sus dianas no depende del ambiente celular en el que tiene lugar. El hecho de que en el análisis de ETD-MS/MS de la CP del PPV *O*-GlcNAcilada en *E. coli* no se detectaran dos de las *O*-GlcNAcilaciones, en Thr-50, Thr-54 o Thr-58, que sí se observan en los viriones del PPV producido en plantas infectadas se debe probablemente a una menor eficiencia de *O*-GlcNAcilación del sistema heterólogo (Kim y col., 2011). Se sabe que la OGT de los mamíferos sufre modificaciones postraduccionales y forma parte de complejos multiproteicos (Hart y col., 2011); si SEC se comporta de manera similar en la células vegetales, la debilidad de la *O*-GlcNAcilación de la CP del PPV observada en el sistema de expresión bacteriano podría deberse a la ausencia de algunos factores accesorios que no afectan a la especificidad de sustrato, pero estimulan la actividad enzimática. Aunque no hay una secuencia consenso estricta, los sitios de *O*-GlcNAcilación parecen compartir algunas peculiaridades, principalmente la proximidad de un residuo de prolina y un ambiente rico en serinas y treoninas. Se ha desarrollado un algoritmo de predicción, OGlcNAcScan, en base a una serie de datos de entrenamiento de 373 sitios de *O*-GlcNAcilación identificados experimentalmente, la mayoría de proteínas de mamíferos (Wang y col., 2011). OGlcNAcScan es capaz de identificar, aunque con una baja puntuación, a Thr-19, Thr-24 y Thr-53, como posible sitios *O*-GlcNAcilados, con un falso positivo para Ser-62. Teniendo en cuenta la limitada capacidad del algoritmo de predicción, el resultado sugiere que la selección de sitios de modificación es similar para las OGTs de mamíferos y SEC.

V.3. PAPEL DE LA O-GlcNAcILACIÓN DE LA CP EN LA INFECCIÓN DEL PPV

En esta tesis, hemos integrado las siete mutaciones T a A que habíamos comprobado que afectaban a la O-GlcNAcILACIÓN de la CP del PPV en un mutante múltiple, CP7T/A. No se observó ninguna O-GlcNAcILACIÓN en la CP de viriones de PPV CP7T/A (Fig. IV.19), a pesar de que Ser-65, que se había detectado unida a O-GlcNAc en el estudio de ETD MS/MS (Fig. IV.18 y tabla IV.2), no había sido mutada. Este dato refuerza la conclusión del efecto remoto de al menos una de las mutaciones T a A enunciada antes, sin embargo no es posible discernir entre una alteración directa de la secuencia de reconocimiento de SEC y la posible necesidad de que algún sitio se O-GlcNAcile para que la proteína se modifique también en otra posición.

Ninguna de las mutaciones puntuales T a A que hemos producido tenía un efecto apreciable sobre la infección del PPV en plantas de *Nicotiana* o de *P. persica* (Fig. IV.7 y IV.16). El múltiple mutante CP7T/A también infectaba estos huéspedes de manera similar al PPV silvestre (Fig. IV.20). La escasa relevancia de la ausencia de glicosilación de la CP PPV CP7T/A en la infección de *N. clevelandii* se ve apoyada por la persistencia del virus mutante junto con el PPV silvestre en el experimento de competición en el que las plantas se inoculaban con una mezcla de los dos virus (Fig. IV.22). Este resultado contrasta con el efecto leve, pero claro, de la reducción de la actividad SEC por RNAi en la fase temprana de la infección del PPV silvestre de plantas transgénicas de *N. benthamiana* (Fig. IV.28). El aparente desacuerdo se debe probablemente a que los niveles de acumulación de PPV CP7T/A se analizaron a 21dpi, un tiempo muy tardío para detectar leves deficiencias debidas a la ausencia de O-GlcNAcILACIÓN de la CP; pero no podemos descartar la posibilidad de que en las plantas de *N. benthamiana* transgénicas la deficiencia de SEC afecte, además de a la CP, a la actividad de otras proteínas del virus o de la planta relevantes para la infección del PPV.

En el caso de *A. thaliana*, la eficiencia de infección de PPV CP7T/A y su competitividad frente al virus silvestre están claramente reducidas (Fig. IV.21 y IV.22). Este resultado sugiere que el deterioro de la infección del PPV en plantas de *A. thaliana* deficientes de SEC (Fig. IV.2) es principalmente debida a la falta de glicosilación de la CP viral. Esta conclusión se ve apoyada por la persistencia de virus mutante y silvestre cuando los experimentos de competición se realizaron en un mutante *sec* de *A. thaliana* (Fig. IV.22), lo que también sugiere que las siete mutaciones T a A de PPV CP7T/A no causan una pérdida de eficacia biológica por sí mismas. La selección específica del virus silvestre en las infecciones

mixtas en *A. thaliana* silvestre demuestra también que, aunque se ha descrito heteroencapsidación en infecciones potyvrales (Varrelmann y Maiss, 2000), el mutante CP7T/A no puede rescatarse por este proceso. En nuestro laboratorio ya se había descrito la imposibilidad de que la heteroencapsidación rescatara a una mutación de la CP del PPV en un experimento de competición entre PPV silvestre y el mutante NAT (Salvador y col., 2008a). La falta de complementación de defectos de la CP puede deberse a restricciones para que varias moléculas de RNA genómico den lugar al comienzo de la replicación viral en una misma célula, como se puede deducir de la observación de que la mayoría de los focos de infección primarios en infecciones mixtas de dos potyvirus deriven de solo un genotipo (Zwart y col., 2011), o a cierta preferencia de la CP para interactuar con el RNA que sirvió de molde para su síntesis.

La ausencia de *O*-GlcNAcilación parece causar inestabilidad en las tres plantas ensayadas, pero el efecto era mucho más acusado en *A. thaliana*, lo que puede explicar la reducida eficiencia de infección en este huésped (Fig. IV.23 y IV.24 y Fig. IV.21 y IV.22). Aunque el comportamiento *in vitro* no reproduce necesariamente lo que ocurre en las células infectadas, los resultados de esta tesis sugieren un papel importante de la *O*-GlcNAcilación en el ensamblaje o la estabilidad de los viriones, o en la estabilidad de la CP. Aunque se conoce poco acerca de los posibles efectos de la *O*-GlcNAcilación en el ensamblaje de los viriones, se ha descrito que esta modificación puede tanto aumentar (Butkinaree y col., 2010) como reducir (Srikanth y col., 2010) la estabilidad de proteínas diana. Se piensa que la *O*-GlcNAcilación estabiliza las proteínas interfiriendo con la fosforilación de dominios PEST (Butkinaree y col., 2010). Sin embargo, aunque se ha comprobado que la CP del PPV está fosforilada (Fernández-Fernández y col., 2002a), datos preliminares de MS sugieren que la ausencia de *O*-GlcNAcilación no está asociada con estimulación de la fosforilación de la CP del PPV. Hay que destacar también que, aunque se ha descrito en sistemas de mamífero que la *O*-GlcNAcilación y la fosforilación pueden afectar a los mismos residuos de la proteína, y se ha sugerido que una misma serina de la proteína CmPP16-1 del floema de calabaza puede estar tanto *O*-GlcNAcilada como fosforilada, resultados recientes de nuestro laboratorio indican que la CP del PPV se *O*-GlcNAcila y fosforila en residuos distintos. Por otra parte, el programa ePESTfind (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/epestfind>; visitado el 17 de septiembre de 2013) no identifica ningún potencial motivo PEST en la CP del PPV. En cualquier caso, no se puede descartar la posibilidad de que el papel de la *O*-GlcNAcilación de la CP en la infección del PPV pueda estar mediada, parcial o totalmente, por efectos en la fosforilación de la proteína. El hecho de que las estabildades de las CP del PPV silvestre y

CP7T/A sean similares en extractos de *A. thaliana* deficientes en SEC (Fig. IV.24) sugiere que es la falta de los residuos *O*-GlcNAc, más que las mutaciones de T a A per se, lo que, directa o indirectamente, promueve la inestabilidad de la CP. Es importante destacar que la estabilidad de la CP silvestre y la de la proteína CP7T/A - sin modificación por *O*-GlcNAc - en las plantas de *A. thaliana* carentes de SEC es mayor que la de esta CP mutada en plantas silvestres de *A. thaliana* (Fig. IV.24). Este dato sugiere que la *O*-GlcNAcilación de factores del huésped aún por descubrir puede promover la degradación de la CP del PPV. Se necesitan estudios adicionales para conocer cómo la *O*-GlcNAcilación afecta a la estructura del virión y/o a la estabilidad de la CP, el posible papel de la fosforilación en estas facetas y su relevancia para las diferentes etapas del ciclo reproductivo del virus. Se ha propuesto que la fosforilación de la CP podría contribuir a la activación traduccional del virión (Atabekov y col., 2001; Zayakina y col., 2008) y a una distribución correcta del RNA viral en los diferentes procesos en los que participa (traducción, replicación, encapsidación, movimiento) (Ivanov y col., 2003; Ivanov y col., 2001), y la *O*-GlcNAcilación podría participar también en esta función reguladora. Por otra parte, se ha descrito que la fosforilación de proteínas de movimiento de virus afectan a su función en la propagación del virus (Karger y col., 2003; Kawakami y col., 2003; Samuilova y col., 2013; Trutnyeva y col., 2005) y se ha comprobado la importancia de la *O*-GlcNAcilación en la regulación del movimiento intercelular de proteínas (Taoka y col., 2007). En los potyvirus la CP funciona como una proteína de movimiento (Rojas y col., 1997), por lo que se ha propuesto que la *O*-GlcNAcilación de la CP podría facilitar de alguna manera el movimiento del virus; sin embargo, aún no hay datos experimentales que apoyen esta especulación (Taoka y col., 2007).

Otra cuestión por resolver planteada por los resultados de esta tesis es por qué la importancia de la *O*-GlcNAcilación de la CP en la infección del PPV es diferente en diferentes huéspedes. Mientras que el ensayo de competición era incapaz de detectar defectos de eficacia biológica de PPV-CP7T/A en *N. clevelandii*, la estabilidad de la CP y la acumulación viral se veían reducidos por la deficiencia de *O*-GlcNAcilación en todos los huéspedes analizados, aunque el efecto era mucho más acusado en *A. thaliana* (Fig. IV.22, 23, 24, 20, y 21). Así pues, la *O*-GlcNAcilación parece ser relevante para la infección del PPV en todos sus huéspedes. Puesto que la *O*-GlcNAcilación se ve afectada por el status metabólico celular y protege al organismo frente algunas situaciones de estrés, sería interesante conocer si la importancia de la modificación por *O*-GlcNAc en la infección varía cuando cambian las condiciones de crecimiento de la planta huésped.

Finalmente, es interesante resaltar que la demostración de la importancia de la *O*-GlcNAcilación para la infección abre una nueva vía para el diseño de estrategias antivirales contra un virus de tanta relevancia socioeconómica como el PPV. Si SEC es un factor no esencial para los huéspedes naturales del PPV, como para sus huéspedes experimentales *A. thaliana* y *N. benthamiana*, la eliminación o la disminución de la expresión de SEC podría contribuir a reducir la susceptibilidad a la sharka sin costes agronómicos notables.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- La modificación por *O*-GlcNAc de la CP del PPV se da de una manera similar en plantas de *A. thaliana*, *N. benthamiana* y *N. clevelandii*.
- Es SECRET AGENT, y no SPINDLY, la OGT de plantas que modifica por *O*-GlcNAc a la CP del PPV.
- La *O*-GlcNAcilación por SECRET AGENT en plantas es similar a la observada en proteínas animales.
- Se ha demostrado por mapeo mutacional y análisis por ETD MS/MS que la proteína CP del PPV está modificada por residuos *O*-GlcNAc en las treoninas 19, 24, 41, 53, 54 y/o 58 y en la serina 65. Una mutación en Thr-50 también altera el patrón de *O*-GlcNAcilación de CP, por lo que es posible que esta treonina pueda también modificarse.
- La eliminación de más de una diana de *O*-GlcNAcilación en la CP del PPV por algunas mutaciones individuales, y la carencia aparentemente completa de esta modificación en un mutante que aún conserva Ser-65, indican que el reconocimiento por SEC es muy sensible a pequeñas variaciones de secuencia en el entorno del residuo a modificar.
- La falta de *O*-GlcNAcilación de la CP del PPV, ya sea por una deficiencia en la OGT SECRET AGENT o por mutaciones en el genoma viral, afecta a la competencia del virus en todos los huéspedes analizados, especialmente en *Arabidopsis thaliana* y a tiempos tempranos de la infección.
- La *O*-GlcNAcilación de la CP del PPV aumenta su estabilidad, puede que estimulando el ensamblaje o la estabilidad de los viriones.
- Aunque la *O*-GlcNAcilación de la CP del PPV no es esencial para la viabilidad viral, es probable que esta modificación tenga un efecto modulador de la infección en condiciones naturales que le facilite al virus adaptarse a diferentes huéspedes y a ambientes diversos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M.J., Zerbini, F.M., French, R., Rabenstein, F., Stenger, D.C., Valkonen, J.P.T.**, 2012. Family *Potyviridae*, in: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), *Virus Taxonomy*. Elsevier, Oxford, pp. 1069-1090.
- Allison, R.F., Dougherty, W.G., Parks, T.D., Willis, L., Johnston, R.E., Kelly, M., Armstrong, F.B.**, 1985. Biochemical analysis of the capsid protein gene and capsid protein of tobacco etch virus: N-terminal amino acids are located on the virion's surface. *Virology* **147**, 309-316.
- Andersen, K., Johansen, I.E.**, 1998. A single conserved amino acid in the coat protein gene of pea seed-borne mosaic potyvirus modulates the ability of the virus to move systemically in *Chenopodium quinoa*. *Virology* **241**, 304-311.
- Andrejeva, J., Puurand, U., Merits, A., Rabenstein, F., Jarvekulg, L., Valkonen, J.P.**, 1999. Potyvirus helper component-proteinase and coat protein (CP) have coordinated functions in virus-host interactions and the same CP motif affects virus transmission and accumulation. *J. Gen. Virol.* **80**, 1133-1139.
- Aparicio, F., Thomas, C.L., Lederer, C., Niu, Y., Wang, D., Maule, A.J.**, 2005. Virus induction of heat shock protein 70 reflects a general response to protein accumulation in the plant cytosol. *Plant Physiol.* **138**, 529-536.
- Apweiler, R., Hermjakob, H., Sharon, N.**, 1999. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim. Biophys. Acta* **1473**, 4-8.
- Atabekov, J.G., Rodionova, N.P., Karpova, O.V., Kozlovsky, S.V., Novikov, V.K., Arkhipenko, M.V.**, 2001. Translational activation of encapsidated potato virus X RNA by coat protein phosphorylation. *Virology* **286**, 466-474.
- Atanasoff**, 1932. Plum pox. A new virus disease. *Yearbook University of Sofia, Faculty of Agriculture* **11**, 49-69.
- Atreya, C.D., Raccah, B., Pirone, T.P.**, 1990. A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. *Virology* **178**, 161-165.
- Atreya, P.L., Atreya, C.D., Pirone, T.P.**, 1991. Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 7887-7891.
- Banerjee, S., Robbins, P.W., Samuelson, J.**, 2009. Molecular characterization of nucleocytosolic *O*-GlcNAc transferases of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*. *Glycobiology* **19**, 331-336.
- Barba, M., Hadidi, A., Candresse, T., Cambra, M.**, 2011. Plum pox virus, in: Hadidi, A., Barba, M., Candresse, T., Jelkmann, W. (Eds.), *Virus and virus-like disease of pome and stone fruits*. APS Press, St. Paul, MN, USA, pp. 185-197.
- Baulcombe, D., Chapman, S., Santa Cruz, S.**, 1995. Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant J.* **7**, 1045-1053.
- Beauchemin, C., Boutet, N., Laliberte, J.F.**, 2007. Visualization of the interaction between the precursors of VPg, the viral protein linked to the genome of *Turnip mosaic virus*, and the translation eukaryotic initiation factor iso 4E in planta. *J. Virol.* **81**, 775-782.
- Beausoleil, S.A., Jedrychowski, M., Schwartz, D., Elias, J.E., Villen, J., Li, J., Cohn, M.A., Cantley, L.C., Gygi, S.P.**, 2004. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 12130-12135.
- Benfey, P.N., Linstead, P.J., Roberts, K., Schiefelbein, J.W., Hauser, M.T., Aeschbacher, R.A.**, 1993. Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* **119**, 57-70.

- Blanc, S., Lopez-Moya, J.J., Wang, R., Garcia-Lampasona, S., Thornbury, D.W., Pirone, T.P., 1997.** A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology* **231**, 141-147.
- Blom, N., Gammeltoft, S., Brunak, S., 1999.** Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* **294**, 1351-1362.
- Blom, N., Sicheritz-Ponten, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., Brunak, S., 2004.** Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* **4**, 1633-1649.
- Bodin, M., Glasa, M., Verger, D., Costes, E., Dosba, F., 2003.** Distribution of the spur cherry isolated of Plum Pox virus in infected prunus rootstocks. *J. Phytopathol.* **151**, 625-630.
- Bond, M.R., Hanover, J.A., 2013.** O-GlcNAc cycling: A link between metabolism and chronic disease. *Annu. Rev. Nutr.* **33**, 205-229.
- Bouche, C., Serdy, S., Kahn, C.R., Goldfine, A.B., 2004.** The cellular fate of glucose and its relevance in type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* **25**, 807-830.
- Butkinaree, C., Cheung, W.D., Park, S., Park, K., Barber, M., Hart, G.W., 2008.** Characterization of beta-N-acetylglucosaminidase cleavage by caspase-3 during apoptosis. *J. Biol. Chem.* **283**, 23557-23566.
- Butkinaree, C., Park, K., Hart, G.W., 2010.** O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim. Biophys. Acta* **1800**, 96-106.
- Cambra, M., Capote, N., Myrta, A., Llácer, G., 2006.** Plum pox virus and the estimated costs associated with sharka disease. *EPPO Bulletin* **36**, 202-204.
- Carbonell, A., Maliogka, V.I., Pérez, J.J., Salvador, B., San León, D., Garcia, J.A., Simón-Mateo, C., 2013.** Diverse amino acid changes at specific positions in the N-terminal region of the coat protein allow *Plum pox virus* to adapt to new hosts. *Mol. Plant Microbe Interact.* **26**, 1211-1224.
- Chen, D., Juárez, S., Hartweck, L., Alamillo, J.M., Simón-Mateo, C., Pérez, J.J., Fernández-Fernández, M.R., Olszewski, N.E., García, J.A., 2005.** Identification of secret agent as the O-GlcNAc transferase that participates in Plum pox virus infection. *J. Virol.* **79**, 9381-9387.
- Cheng, X., Hart, G.W., 2001.** Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta: post-translational regulation of turnover and transactivation activity. *J. Biol. Chem.* **276**, 10570-10575.
- Cheung, W.D., Hart, G.W., 2008.** AMP-activated protein kinase and p38 MAPK activate O-GlcNAcylation of neuronal proteins during glucose deprivation. *J. Biol. Chem.* **283**, 13009-13020.
- Chung, B.Y., Miller, W.A., Atkins, J.F., Firth, A.E., 2008.** An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 5897-5902.
- Comer, F.I., Hart, G.W., 2000.** O-Glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate. *J. Biol. Chem.* **275**, 29179-29182.
- Crescenzi, A., d'Aquino, L., Comes, S., Nuzzaci, M., Piazzola, P., Boscia, D., Hadidi, A., 1997.** Characterization of the sweet cherry isolated of *Plum pox virus*. *Plant Dis.* **81**, 711-714.
- Daròs, J.A., Carrington, J.C., 1997.** RNA binding activity of NIa proteinase of tobacco etch potyvirus. *Virology* **237**, 327-336.
- de Beer, T., Vliegthart, J.F., Löffler, A., Hofsteenge, J., 1995.** The hexopyranosyl residue that is C-glycosidically linked to the side chain of tryptophan-7 in human RNase U is alpha-mannopyranose. *Biochemistry (Mosc).* **34**, 11785-11789.
- Dolja, V.V., Haldeman, R., Robertson, N.L., Dougherty, W.G., Carrington, J.C., 1994.** Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO J.* **13**, 1482-1491.

- Dolja, V.V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A.E., Vandenbosch, K.A., Carrington, J.C.**, 1995. Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology* **206**, 1007-1016.
- Dombrovsky, A., Huët, H., Chejanovsky, N., Raccach, B.**, 2005. Aphid transmission of a potyvirus depends on suitability of the helper component and the N terminus of the coat protein. *Arch. Virol.* **150**, 287-298.
- Doucey, M.A., Hess, D., Blommers, M.J., Hofsteenge, J.**, 1999. Recombinant human interleukin-12 is the second example of a C-mannosylated protein. *Glycobiology* **9**, 435-441.
- Dunker, A.K., Brown, C.J., Lawson, J.D., Iakoucheva, L.M., Obradovic, Z.**, 2002. Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry (Mosc)*. **41**, 6573-6582.
- Erickson, P.R., Herzberg, M.C.**, 1993. Evidence for the covalent linkage of carbohydrate polymers to a glycoprotein from *Streptococcus sanguis*. *J. Biol. Chem.* **268**, 23780-23783.
- Fang, B., Miller, M.W.**, 2001. Use of galactosyltransferase to assess the biological function of O-linked N-acetyl-d-glucosamine: a potential role for O-GlcNAc during cell division. *Exp. Cell Res.* **263**, 243-253.
- Feki, S., Loukili, M.J., Triki-Marrakchi, R., Karimova, G., Old, I., Ounouna, H., Nato, A., Nato, F., Guesdon, J.-L., Lafaye, P., A., B.A.E.**, 2005. Interaction between tobacco Ribulose-1,5-biphosphate Carboxylase/Oxygenase large subunit (RubisCO-LSU) and the PVY Coat Protein (PVY-CP). *Eur. J. Plant Pathol.* **112**, 221-234.
- Fellers, J., Wan, J., Hong, Y., Collins, G.B., Hunt, A.G.**, 1998. In vitro interactions between a potyvirus-encoded, genome-linked protein and RNA-dependent RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* **79**, 2043-2049.
- Ferguson, M.A.**, 1999. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J. Cell Sci.* **112**, 2799-2809.
- Fernandez, A., Guo, H.S., Saenz, P., Simon-Buela, L., Gomez de Cedron, M., Garcia, J.A.**, 1997. The motif V of plum pox potyvirus CI RNA helicase is involved in NTP hydrolysis and is essential for virus RNA replication. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4474-4480.
- Fernández-Fernández, M.R., Camafeita, E., Bonay, P., Méndez, E., Albar, J.P., García, J.A.**, 2002a. The capsid protein of a plant single-stranded RNA virus is modified by O-linked N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* **277**, 135-140.
- Fernández-Fernández, M.R., Martínez-Torrecuadrada, J.L., Casal, J.I., García, J.A.**, 1998. Development of an antigen presentation system based on plum pox potyvirus. *FEBS Lett.* **427**, 229-235.
- Fernández-Fernández, M.R., Martínez-Torrecuadrada, J.L., Roncal, F., Domínguez, E., García, J.A.**, 2002b. Identification of immunogenic hot spots within plum pox potyvirus capsid protein for efficient antigen presentation. *J. Virol.* **76**, 12646-12653.
- Fernández-Fernández, M.R., Mouriño, M., Rivera, J., Rodríguez, F., Plana-Durán, J., García, J.A.**, 2001. Protection of rabbits against rabbit hemorrhagic disease virus by immunization with the VP60 protein expressed in plants with a potyvirus-based vector. *Virology* **280**, 283-291.
- Forsythe, M.E., Love, D.C., Lazarus, B.D., Kim, E.J., Prinz, W.A., Ashwell, G., Krause, M.W., Hanover, J.A.**, 2006. *Caenorhabditis elegans* ortholog of a diabetes susceptibility locus: oga-1 (O-GlcNAcase) knockout impacts O-GlcNAc cycling, metabolism, and dauer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 11952-11957.
- Gao, Y., Wells, L., Comer, F.I., Parker, G.J., Hart, G.W.**, 2001. Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain. *J. Biol. Chem.* **276**, 9838-9845.
- García, J.A., Cambra, M.**, 2007. Plum pox virus and sharka disease. *Plant Viruses* **1**, 69-79.

- García, J.A., Glasa, M., Cambra, M., Candresse, T., 2013.** Plum pox virus and sharka: a model potyvirus and a major disease. *Mol. Plant Pathol.* En prensa.
- Gewinner, C., Hart, G., Zachara, N., Cole, R., Beisenherz-Huss, C., Groner, B., 2004.** The coactivator of transcription CREB-binding protein interacts preferentially with the glycosylated form of Stat5. *J. Biol. Chem.* **279**, 3563-3572.
- Glasa, M., Candresse, T., 2005.** Plum pox virus. *C.M.I. /A.A.B. Descriptions of plant viruses* No. 410.
- Glasa, M., Paunovic, S., Jevremovic, D., Myrta, A., Pttnerova, S., Candresse, T., 2005.** Analysis of recombinant Plum pox virus (PPV) isolates from Serbia confirms genetic homogeneity and supports a regional origin of the PPV-Rec subgroup. *Arch. Virol.* **150**, 2051-2060.
- Gonzalez, S.A., Burrone, O.R., 1991.** Rotavirus NS26 is modified by addition of single O-linked residues of N-acetylglucosamine. *Virology* **182**, 8-16.
- Goodin, M.M., Zaitlin, D., Naidu, R.A., Lommel, S.A., 2008.** *Nicotiana benthamiana*: Its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.* **21**, 1015-1026.
- Greenboim-Wainberg, Y., Maymon, I., Borochoy, R., Alvarez, J., Olszewski, N., Ori, N., Eshed, Y., Weiss, D., 2005.** Cross talk between gibberellin and cytokinin: The Arabidopsis GA response Inhibitor SPINDLY plays a positive role in cytokinin signaling. *Plant Cell* **17**, 92-102.
- Greis, K.D., Gibson, W., Hart, G.W., 1994.** Site-specific glycosylation of the human cytomegalovirus tegument basic phosphoprotein (UL32) at serine 921 and serine 952. *J. Virol.* **68**, 8339-8349.
- Griffith, L.S., Schmitz, B., 1999.** O-linked N-acetylglucosamine levels in cerebellar neurons respond reciprocally to perturbations of phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* **262**, 824-831.
- Guha-Niyogi, A., Sullivan, D.R., Turco, S.J., 2001.** Glycoconjugate structures of parasitic protozoa. *Glycobiology* **11**, 45R-59R.
- Hafrén, A., Hofius, D., Ronnholm, G., Sonnewald, U., Mäkinen, K., 2010.** HSP70 and its cochaperone CIP1 promote potyvirus infection in *Nicotiana benthamiana* by regulating viral coat protein functions. *Plant Cell* **22**, 523-535.
- Haltiwanger, R.S., Grove, K., Philipsberg, G.A., 1998.** Modulation of O-linked N-acetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins in vivo using the peptide O-GlcNAc-beta-N-acetylglucosaminidase inhibitor O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate. *J. Biol. Chem.* **273**, 3611-3617.
- Hanover, J.A., Forsythe, M.E., Hennessey, P.T., Brodigan, T.M., Love, D.C., Ashwell, G., Krause, M., 2005.** A *Caenorhabditis elegans* model of insulin resistance: altered macronutrient storage and dauer formation in an OGT-1 knockout. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 11266-11271.
- Hanover, J.A., Krause, M.W., Love, D.C., 2010.** The hexosamine signaling pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine. *Biochim. Biophys. Acta* **1800**, 80-95.
- Hart, G.W., 1997.** Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 315-335.
- Hart, G.W., Housley, M.P., Slawson, C., 2007.** Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* **446**, 1017-1022.
- Hart, G.W., Slawson, C., Ramirez-Correa, G., Lagerlof, O., 2011.** Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 825-858.
- Hartmann, S., Hofsteenge, J., 2000.** Properdin, the positive regulator of complement, is highly C-mannosylated. *J. Biol. Chem.* **275**, 28569-28574.
- Hartweck, L.M., 2008.** Gibberellin signaling. *Planta* **229**, 1-13.

- Hartweck, L.M., Scott, C.L., Olszewski, N.E., 2002.** Two *O*-Linked *N*-Acetylglucosamine transferase genes of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. have overlapping functions necessary for gamete and seed development. *Genetics* **161**, 1279-1291.
- Haynes, P.A., 1998.** Phosphoglycosylation: a new structural class of glycosylation? *Glycobiology* **8**, 1-5.
- He, Y., Bubb, A.K., Stubbs, K.A., Gloster, T.M., Davies, G.J., 2010.** Inhibition of a bacterial O-GlcNAcase homologue by lactone and lactam derivatives: structural, kinetic and thermodynamic analyses. *Amino Acids* **40**, 829-839.
- Heckel, D., Comtesse, N., Brass, N., Blin, N., Zang, K.D., Meese, E., 1998.** Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1859-1872.
- Heese-Peck, A., Cole, R.N., Borkhsenius, O.N., Hart, G.W., Raikhel, N.V., 1995.** Plant nuclear pore complex proteins are modified by novel oligosaccharides with terminal *N*-acetylglucosamine. *Plant Cell* **7**, 1459-1471.
- Heese-Peck, A., Raikhel, N.V., 1998.** A glycoprotein modified with terminal *N*-acetylglucosamine and localized at the nuclear rim shows sequence similarity to aldose-1-epimerases. *Plant Cell* **10**, 599-612.
- Herlitze, S., Koenen, M., 1990.** A general and rapid mutagenesis method using polymerase chain reaction. *Gene* **91**, 143-147.
- Hiromura, M., Choi, C.H., Sabourin, N.A., Jones, H., Bachvarov, D., Usheva, A., 2003.** YY1 is regulated by *O*-linked *N*-acetylglucosaminylation (*O*-glcNAcylation). *J. Biol. Chem.* **278**, 14046-14052.
- Hofius, D., Maier, A.T., Dietrich, C., Jungkunz, I., Bornke, F., Maiss, E., Sonnewald, U., 2007.** Capsid protein-mediated recruitment of host DnaJ-Like proteins is required for *Potato Virus Y* infection in tobacco plants. *J. Virol.* **81**, 11870-11880.
- Holt, G.D., Hart, G.W., 1986.** The subcellular distribution of terminal *N*-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-saccharide linkage, *O*-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.* **261**, 8049-8057.
- Holt, G.D., Snow, C.M., Senior, A., Haltiwanger, R.S., Gerace, L., Hart, G.W., 1987.** Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed *O*-linked *N*-acetylglucosamine. *J. Cell Biol.* **104**, 1157-1164.
- Hong, Y., Hunt, A.G., 1996.** RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* **226**, 146-151.
- Horsch, R.B., Fry, J., Hoffmann, N.L., Wallroth, M., Eichholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T., 1985.** A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**, 1229-1231.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H., 1990.** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- International human genome sequencing consortium, 2004.** Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**, 931-945.
- Ivanov, K.I., Puustinen, P., Gabrenaite, R., Vihinen, H., Rönstrand, L., Valmu, L., Kalkkinen, N., Mäkinen, K., 2003.** Phosphorylation of the potyvirus capsid protein by protein kinase CK2 and its relevance for virus infection. *Plant Cell* **15**, 2124-2139.
- Ivanov, K.I., Puustinen, P., Merits, A., Saarma, M., Mäkinen, K., 2001.** Phosphorylation down-regulates the RNA binding function of the coat protein of potato virus A. *J. Biol. Chem.* **276**, 13530-13540.
- Iyer, S.P., Hart, G.W., 2003.** Roles of the tetratricopeptide repeat domain in *O*-GlcNAc transferase targeting and protein substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **278**, 24608-24616.

- Jacobsen, S.E., Binkowski, K.A., Olszewski, N.E.**, 1996. SPINDLY, a tetratricopeptide repeat protein involved in gibberellin signal transduction in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 9292-9296.
- Jacobsen, S.E., Olszewski, N.E.**, 1993. Mutations at the *SPINDLY* locus of *Arabidopsis* alter gibberellin signal transduction. *Plant Cell* **5**, 887-896.
- James, D., Varga, A.**, 2005. Nucleotide sequence analysis of Plum pox virus isolate W3174: evidence of a new strain. *Virus Res.* **110**, 143-150.
- Johansen, P.G., Marshall, R.D., Neuberger, A.**, 1961. Carbohydrates in protein. 3. The preparation and some of the properties of a glycopeptide from hen's-egg albumin. *Biochem. J.* **78**, 518-527.
- Karger, E.M., Frolova, O.Y., Fedorova, N.V., Baratova, L.A., Ovchinnikova, T.V., Susi, P., Mäkinen, K., Ronnstrand, L., Dorokhov, Y.L., Atabekov, J.G.**, 2003. Dysfunctionality of a tobacco mosaic virus movement protein mutant mimicking threonine 104 phosphorylation. *J. Gen. Virol.* **84**, 727-732.
- Kawakami, S., Hori, K., Hosokawa, D., Okada, Y., Watanabe, Y.**, 2003. Defective tobamovirus movement protein lacking wild-type phosphorylation sites can be complemented by substitutions found in revertants. *J. Virol.* **77**, 1452-1461.
- Kearse, K.P., Hart, G.W.**, 1991. Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 1701-1705.
- Kerlan, C., Dunez, J.**, 1979. Biological and serological differentiation of strains of sharka virus. *Ann. Phytopathol.* **11**, 241-250.
- Khidekel, N., Ficarro, S.B., Clark, P.M., Bryan, M.C., Swaney, D.L., Rexach, J.E., Sun, Y.E., Coon, J.J., Peters, E.C., Hsieh-Wilson, L.C.**, 2007. Probing the dynamics of O-GlcNAc glycosylation in the brain using quantitative proteomics. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 339-348.
- Kim, Y.C., Udeshi, N.D., Balsbaugh, J.L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Olszewski, N.E.**, 2011. O-GlcNAcylation of the *Plum pox virus* capsid protein catalyzed by SECRET AGENT: characterization of O-GlcNAc sites by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Amino Acids* **40**, 869-876.
- Kimalov, B., Gal-On, A., Stav, R., Belausov, E., Arazi, T.**, 2004. Maintenance of coat protein N-terminal net charge and not primary sequence is essential for zucchini yellow mosaic virus systemic infectivity. *J. Gen. Virol.* **85**, 3421-3430.
- Klein, P.G., Klein, R.R., Rodriguez-Cerezo, E., Hunt, A.G., Shaw, J.G.**, 1994. Mutational analysis of the tobacco vein mottling virus genome. *Virology* **204**, 759-769.
- Ko, Y.C., Tsai, W.H., Wang, P.W., Wu, I.L., Lin, S.Y., Chen, Y.L., Chen, J.Y., Lin, S.F.**, 2012. Suppressive regulation of KSHV RTA with O-GlcNAcylation. *J. Biomed. Sci.* **19**, 12.
- Kobayashi, T., Nishizaki, R., Ikezawa, H.**, 1997. The presence of GPI-linked protein(s) in an archaeobacterium, *Sulfolobus acidocaldarius*, closely related to eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* **1334**, 1-4.
- Kreppel, L.K., Blomberg, M.A., Hart, G.W.**, 1997. Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J. Biol. Chem.* **272**, 9308-9315.
- Kwon, S.J., Choi, E.Y., Choi, Y.J., Ahn, J.H., Park, O.K.**, 2006. Proteomics studies of post-translational modifications in plants. *J. Exp. Bot.* **57**, 1547-1551.
- Laemmli, U.K.**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lain, S., Riechmann, J.L., Garcia, J.A.**, 1989. The complete nucleotide sequence of plum pox potyvirus RNA. *Virus Res.* **13**, 157-172.

- Lazarus, B.D., Love, D.C., Hanover, J.A.**, 2006. Recombinant *O*-GlcNAc transferase isoforms: identification of *O*-GlcNAcase, yes tyrosine kinase, and tau as isoform-specific substrates. *Glycobiology* **16**, 415-421.
- Lechner, J., Wieland, F.**, 1989. Structure and biosynthesis of prokaryotic glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 173-194.
- Li, X.H., Valdez, P., Olvera, R.E., Carrington, J.C.**, 1997. Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (NIb): subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (NIa). *J. Virol.* **71**, 1598-1607.
- Llácer, G.**, 2006. Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: Herbaceous hosts. *EPPO Bulletin* **36**, 227-228.
- Logemann, J., Schell, J., Willmitzer, L.**, 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* **163**, 16-20.
- Lohmander, L.S., De Luca, S., Nilsson, B., Hascall, V.C., Caputo, C.B., Kimura, J.H., Heinegard, D.**, 1980. Oligosaccharides on proteoglycans from the swarm rat chondrosarcoma. *J. Biol. Chem.* **255**, 6084-6091.
- López-Moya, J.J., Canto, T., Díaz-Ruiz, J.R., López-Abella, D.**, 1995. Transmission by aphids of a naturally non-transmissible plum pox virus isolate with the aid of potato virus Y helper component. *J. Gen. Virol.* **76**, 2293-2297.
- López-Moya, J.J., Fernández-Fernández, M.R., Cambra, M., García, J.A.**, 2000. Biotechnological aspects of plum pox virus. *J. Biotechnol.* **76**, 121-136.
- López-Moya, J.J., García, J.A.**, 2000. Construction of a stable and highly infectious intron-containing cDNA clone of plum pox potyvirus and its use to infect plants by particle bombardment. *Virus Res.* **68**, 99-107.
- López-Moya, J.J., García, J.A.**, 2008. Potyviruses, in: Mahy, B.W.J., Van Regenmortel, M.H.V. (Eds.), *Encyclopedia of Virology*, Third Edition. Elsevier, Oxford, pp. 313-322.
- López-Moya, J.J., Pirone, T.P.**, 1998. Charge changes near the N terminus of the coat protein of two potyviruses affect virus movement. *J. Gen. Virol.* **79**, 161-165.
- López-Moya, J.J., Valli, A., García, J.A.**, 2009. Potyviridae, *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, p. <http://www.els.net/> [DOI: 10.1002/9780470015902.a9780470000755.pub9780470015902].
- Lubas, W.A., Frank, D.W., Krause, M., Hanover, J.A.**, 1997. *O*-Linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. *J. Biol. Chem.* **272**, 9316-9324.
- Maiss, E., Timpe, U., Briske-Rode, A., Lesemann, D.E., Casper, R.**, 1992. Infectious in vivo transcripts of a plum pox potyvirus full-length cDNA clone containing the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter. *J. Gen. Virol.* **73**, 709-713.
- Majewska-Sawka, A., Nothnagel, E.A.**, 2000. The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant Physiol.* **122**, 3-10.
- Majumdar, G., Harmon, A., Candelaria, R., Martinez-Hernandez, A., Raghov, R., Solomon, S.S.**, 2003. O-glycosylation of Sp1 and transcriptional regulation of the calmodulin gene by insulin and glucagon. *Am. J. Physiol.* **285**, E584-591.
- Manoussopoulos, I.N., Maiss, E., Tsagris, M.**, 2000. Native electrophoresis and Western blot analysis (NEWeB): a method for characterization of different forms of potyvirus particles and similar nucleoprotein complexes in extracts of infected plant tissues. *J. Gen. Virol.* **81**, 2295-2298.
- Martin, M.T., Garcia, J.A.**, 1991. Plum pox potyvirus RNA replication in a crude membrane fraction from infected *Nicotiana clevelandii* leaves. *J. Gen. Virol.* **72**, 785-790.
- Martin, S.E., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Marto, J.A.**, 2000. Subfemtomole MS and MS/MS peptide sequence analysis using nano-HPLC micro-ESI fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal. Chem.* **72**, 4266-4274.

- Martinez, L.O., Agerholm-Larsen, B., Wang, N., Chen, W., Tall, A.R., 2003.** Phosphorylation of a pest sequence in ABCA1 promotes calpain degradation and is reversed by ApoA-I. *J. Biol. Chem.* **278**, 37368-37374.
- Martinez-Fleites, C., He, Y., Davies, G.J., 2010.** Structural analyses of enzymes involved in the O-GlcNAc modification. *Biochim. Biophys. Acta* **1800**, 122-133.
- McClain, D.A., Lubas, W.A., Cooksey, R.C., Hazel, M., Parker, G.J., Love, D.C., Hanover, J.A., 2002.** Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 10695-10699.
- Mechref, Y., Novotny, M.V., 2002.** Structural investigations of glycoconjugates at high sensitivity. *Chem. Rev.* **102**, 321-369.
- Medina, L., Grove, K., Haltiwanger, R.S., 1998.** SV40 large T antigen is modified with O-linked N-acetylglucosamine but not with other forms of glycosylation. *Glycobiology* **8**, 383-391.
- Mehta, D.P., Ichikawa, M., Salimath, P.V., Etchison, J.R., Haak, R., Manzi, A., Freeze, H.H., 1996.** A lysosomal cysteine proteinase from *Dictyostelium discoideum* contains N-acetylglucosamine-1-phosphate bound to serine but not mannose-6-phosphate on N-linked oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **271**, 10897-10903.
- Messner, P., 1997.** Bacterial glycoproteins. *Glycoconj. J.* **14**, 3-11.
- Montreuil, J., 1980.** Primary structure of glycoprotein glycans: basis for the molecular biology of glycoproteins. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **37**, 157-223.
- Mullis, K.G., Haltiwanger, R.S., Hart, G.W., Marchase, R.B., Engler, J.A., 1990.** Relative accessibility of N-acetylglucosamine in trimers of the adenovirus types 2 and 5 fiber proteins. *J. Virol.* **64**, 5317-5323.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962.** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* **15**, 473-497.
- Nayak, B.R., Spiro, R.G., 1991.** Localization and structure of the asparagine-linked oligosaccharides of type IV collagen from glomerular basement membrane and lens capsule. *J. Biol. Chem.* **266**, 13978-13987.
- O'Donnell, N., 2002.** Intracellular glycosylation and development. *Biochim. Biophys. Acta* **1573**, 336-345.
- Olszewski, N.E., West, C.M., Sassi, S.O., Hartweck, L.M., 2010.** O-GlcNAc protein modification in plants: Evolution and function. *Biochim. Biophys. Acta* **1800**, 49-56.
- Parthasarathy, N., Spiro, R.G., 1984.** Isolation and characterization of the heparan sulfate proteoglycan of the bovine glomerular basement membrane. *J. Biol. Chem.* **259**, 12749-12755.
- Pawson, T., Nash, P., 2003.** Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* **300**, 445-452.
- Perez-Vilar, J., Eckhardt, A.E., Hill, R.L., 1996.** Porcine submaxillary mucin forms disulfide-bonded dimers between its carboxyl-terminal domains. *J. Biol. Chem.* **271**, 9845-9850.
- Privalsky, M.L., 1990.** A subpopulation of the avian erythroblastosis virus v-erbA protein, a member of the nuclear hormone receptor family, is glycosylated. *J. Virol.* **64**, 463-466.
- Rakitina, D.V., Kantidze, O.L., Leshchiner, A.D., Solovyev, A.G., Novikov, V.K., Morozov, S.Y., Kalinina, N.O., 2005.** Coat proteins of two filamentous plant viruses display NTPase activity in vitro. *FEBS Lett.* **579**, 4955-4960.
- Rechsteiner, M., Rogers, S.W., 1996.** PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 267-271.
- Restrepo-Hartwig, M.A., Carrington, J.C., 1994.** The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. *J. Virol.* **68**, 2388-2397.

- Riechmann, J.L., Lain, S., Garcia, J.A.**, 1989. The genome-linked protein and 5' end RNA sequence of plum pox potyvirus. *J. Gen. Virol.* **70**, 2785-2789.
- Riechmann, J.L., Lain, S., Garcia, J.A.**, 1991. Identification of the initiation codon of plum pox potyvirus genomic RNA. *Virology* **185**, 544-552.
- Rodriguez-Cerezo, E., Ammar, E.D., Pirone, T.P., Shaw, J.G.**, 1993. Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *J. Gen. Virol.* **74**, 1945-1949.
- Rojas, M.R., Zerbini, F.M., Allison, R.F., Gilbertson, R.L., Lucas, W.J.**, 1997. Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* **237**, 283-295.
- Roos, M.D., Su, K., Baker, J.R., Kudlow, J.E.**, 1997. O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6472-6480.
- Roudet-Tavert, G., German-Retana, S., Delaunay, T., Delecalle, B., Candresse, T., Le Gall, O.**, 2002. Interaction between potyvirus helper component-proteinase and capsid protein in infected plants. *J. Gen. Virol.* **83**, 1765-1770.
- Roy, A.S.S., I. M.**, 1994. Plum pox situation in Europe. *EPPO Bulletin* **24**, 515-523.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N.**, 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- Sakabe, K., Hart, G.W.**, 2010. O-GlcNAc transferase regulates mitotic chromatin dynamics. *J. Biol. Chem.* **285**, 34460-34468.
- Salvador, B., Delgadillo, M.O., Sáenz, P., García, J.A., Simón-Mateo, C.**, 2008a. Identification of *Plum pox virus* pathogenicity determinants in herbaceous and woody hosts. *Mol. Plant Microbe Interact.* **21**, 20-29.
- Salvador, B., Sáenz, P., Yángüez, E., Quiot, J.B., Quiot, L., Delgadillo, M.O., García, J.A., Simón-Mateo, C.**, 2008b. Host-specific effect of P1 exchange between two potyviruses. *Mol. Plant Pathol.* **9**, 147-155.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.**, 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Samuilova, O., Santala, J., Valkonen, J.P.**, 2013. Tyrosine phosphorylation of the triple gene block protein 3 regulates cell-to-cell movement and protein interactions of *Potato mop-top virus*. *J. Virol.* **87**, 4313-4321.
- Schindelman, G., Morikami, A., Jung, J., Baskin, T.I., Carpita, N.C., Derbyshire, P., McCann, M.C., Benfey, P.N.**, 2001. COBRA encodes a putative GPI-anchored protein, which is polarly localized and necessary for oriented cell expansion in Arabidopsis. *Genes Dev.* **15**, 1115-1127.
- Schouppe, D., Ghesquiere, B., Menschaert, G., De Vos, W.H., Bourque, S., Trooskens, G., Proost, P., Gevaert, K., Van Damme, E.J.**, 2011. Interaction of the tobacco lectin with histone proteins. *Plant Physiol.* **155**, 1091-1102.
- Scott, C.L., Hartweck, L.M., Pérez, J.d.J., Chen, D., García, J.A., Olszewski, N.E.**, 2006. SECRET AGENT, an *Arabidopsis thaliana* O-GlcNAc transferase, modifies the *Plum pox virus* capsid protein. *FEBS Lett.* **580**, 5829-5835.
- Sedbrook, J.C., Carroll, K.L., Hung, K.F., Masson, P.H., Somerville, C.R.**, 2002. The Arabidopsis SKU5 gene encodes an extracellular glycosyl phosphatidylinositol-anchored glycoprotein involved in directional root growth. *Plant Cell* **14**, 1635-1648.
- Seo, J.K., Kang, S.H., Seo, B.Y., Jung, J.K., Kim, K.H.**, 2010. Mutational analysis of interaction between coat protein and helper component-proteinase of Soybean mosaic virus involved in aphid transmission. *Mol. Plant Pathol.* **11**, 265-276.
- Shafi, R., Iyer, S.P., Ellies, L.G., O'Donnell, N., Marek, K.W., Chui, D., Hart, G.W., Marth, J.D.**, 2000. The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is

essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 5735-5739.

Shukla, D.D., Strike, P.M., Tracy, S.L., Gough, K.H., Ward, C.W., 1988. The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface-located and the N-terminus contains the major virus-specific epitopes. *J. Gen. Virol.* **69**, 1497-1508.

Shukla, D.D., Ward, C.W., Brunt, A.A., 1994. Genome structure, variation and function, in: Shukla, D.D., Ward, C.W., Brunt, A.A. (Eds.), *The Potyviridae*. CAB International, Cambridge, pp. 74-112.

Silverstone, A.L., Tseng, T.S., Swain, S.M., Dill, A., Jeong, S.Y., Olszewski, N.E., Sun, T.P., 2007. Functional analysis of SPINDLY in gibberellin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **143**, 987-1000.

Simón-Buela, L., Guo, H.S., García, J.A., 1997. Cap-independent leaky scanning as the mechanism of translation initiation of a plant viral genomic RNA. *J. Gen. Virol.* **78**, 2691-2699.

Slawson, C., Hart, G.W., 2003. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate: the sweet side of protein regulation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 631-636.

Slawson, C., Lakshmanan, T., Knapp, S., Hart, G.W., 2008. A mitotic GlcNAcylation/phosphorylation signaling complex alters the posttranslational state of the cytoskeletal protein vimentin. *Mol. Biol. Cell* **19**, 4130-4140.

Sochor, J., Babula, P., Adam, V., Krska, B., Kizek, R., 2012. Sharka: the past, the present and the future. *Viruses* **4**, 2853-2901.

Sothorn, R.B., Tseng, T.S., Orcutt, S.L., Olszewski, N.E., Koukkari, W.L., 2002. GIGANTEA and SPINDLY genes linked to the clock pathway that controls circadian characteristics of transpiration in Arabidopsis. *Chronobiol. Int.* **19**, 1005-1022.

Spiro, R.G., 1973. Glycoproteins. *Adv. Protein Chem.* **27**, 349-467.

Spiro, R.G., 2002. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* **12**, 43R-56R.

Srikanth, B., Vaidya, M.M., Kalraiya, R.D., 2010. O-GlcNAcylation determines the solubility, filament organization, and stability of keratins 8 and 18. *J. Biol. Chem.* **285**, 34062-34071.

Srikrishna, G., Wang, L., Freeze, H.H., 1998. Fucose β -1-P-Ser is a new type of glycosylation: using antibodies to identify a novel structure in Dictyostelium discoideum and study multiple types of fucosylation during growth and development. *Glycobiology* **8**, 799-811.

Šubr, Z., Glasa, M., 2013. Unfolding the secrets of plum pox virus: from epidemiology to genomics. *Acta Virol.* **57**, 217-228.

Sugio, A., Dreos, R., Aparicio, F., Maule, A.J., 2009. The cytosolic protein response as a subcomponent of the wider heat shock response in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**, 642-654.

Taoka, K., Ham, B.K., Xoconostle-Cazares, B., Rojas, M.R., Lucas, W.J., 2007. Reciprocal phosphorylation and glycosylation recognition motifs control NCAPP1 interaction with pumpkin phloem proteins and their cell-to-cell movement. *Plant Cell* **19**, 1866-1884.

Tautz, D., Renz, M., 1983. An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal. Biochem.* **132**, 14-19.

Thornton, J.M., 2001. From genome to function. *Science* **292**, 2095-2097.

Thornton, T.M., Swain, S.M., Olszewski, N.E., 1999. Gibberellin signal transduction presents ...the SPY who O-GlcNAc'd me. *Trends Plant Sci* **4**, 424-428.

Torres, C.R., Hart, G.W., 1984. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.* **259**, 3308-3317.

- Trutnyeva, K., Bachmaier, R., Waigmann, E., 2005.** Mimicking carboxyterminal phosphorylation differentially effects subcellular distribution and cell-to-cell movement of *Tobacco mosaic virus* movement protein. *Virology* **332**, 563-577.
- Tseng, T.S., Salomé, P.A., McClung, C.R., Olszewski, N.E., 2004.** SPINDLY and GIGANTEA interact and act in *Arabidopsis thaliana* pathways involved in light responses, flowering, and rhythms in cotyledon movements. *Plant Cell* **16**, 1550-1563.
- Udeshi, N.D., Compton, P.D., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Rose, K.L., 2008.** Methods for analyzing peptides and proteins on a chromatographic timescale by electron-transfer dissociation mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **3**, 1709-1717.
- Ulubaş Serçe, C., Candresse, T., Svanella-Dumas, L., Krizbai, L., Gazel, M., Çağlayan, K., 2009.** Further characterization of a new recombinant group of *Plum pox virus* isolates, PPV-T, found in orchards in the Ankara province of Turkey. *Virus Res.* **142**, 121-126.
- Valli, A., López-Moya, J.J., García, J.A., 2007.** Recombination and gene duplication in the evolutionary diversification of P1 proteins in the family *Potyviridae*. *J. Gen. Virol.* **88**, 1016-1028.
- van Hengel, A.J., Tadesse, Z., Immerzeel, P., Schols, H., van Kammen, A., de Vries, S.C., 2001.** N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiol.* **125**, 1880-1890.
- Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R.A., Schell, J., 1974.** Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* **252**, 169-170.
- Varki, A., 1993.** Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**, 97-130.
- Varki, A., Lowe, J.B., 2009.** Biological roles of glycans, in: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E. (Eds.), *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), pp. 75-89.
- Varrelmann, M., Maiss, E., 2000.** Mutations in the coat protein gene of plum pox virus suppress particle assembly, heterologous encapsidation and complementation in transgenic plants of *Nicotiana benthamiana*. *J. Gen. Virol.* **81**, 567-576.
- Verchot, J., Carrington, J.C., 1995.** Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. *J. Virol.* **69**, 3668-3674.
- Voloudakis, A.E., Malpica, C.A., Aleman-Verdaguer, M.E., Stark, D.M., Fauquet, C.M., Beachy, R.N., 2004.** Structural characterization of Tobacco etch virus coat protein mutants. *Arch. Virol.* **149**, 699-712.
- Walker, D.B., Joshi, G., Davis, A.P., 2009.** Progress in biomimetic carbohydrate recognition. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 3177-3191.
- Walsh, C.T., 2006.** Protein glycosylation. *En: Posttranslational modification of proteins : Expanding nature's inventory*, xxi, 490 p.
- Walsh, C.T., Garneau-Tsodikova, S., Gatto, G.J., Jr., 2005.** Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Ang. Chem.* **44**, 7342-7372.
- Wang, J., Torii, M., Liu, H., Hart, G.W., Hu, Z.Z., 2011.** dbOGAP - an integrated bioinformatics resource for protein O-GlcNAcylation. *BMC Bioinformatics* **12**, 91.
- Wang, Z., Gucek, M., Hart, G.W., 2008.** Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: site-specific phosphorylation dynamics in response to globally elevated O-GlcNAc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 13793-13798.
- Wang, Z., Pandey, A., Hart, G.W., 2007.** Dynamic interplay between O-linked N-acetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 1365-1379.

- Waterhouse, P.M., Graham, H.W., Wang, M.B.**, 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 13959-13964.
- Wells, L., Kreppel, L.K., Comer, F.I., Wadzinski, B.E., Hart, G.W.**, 2004. O-GlcNAc transferase is in a functional complex with protein phosphatase 1 catalytic subunits. *J. Biol. Chem.* **279**, 38466-38470.
- Wells, L., Vosseller, K., Cole, R.N., Cronshaw, J.M., Matunis, M.J., Hart, G.W.**, 2002. Mapping sites of O-GlcNAc modification using affinity tags for serine and threonine post-translational modifications. *Mol. Cell. Proteomics* **1**, 791-804.
- Whitford, M., Faulkner, P.**, 1992. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of a gene encoding gp41, a structural glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* **66**, 4763-4768.
- Wilson, R.N., Somerville, C.R.**, 1995. Phenotypic suppression of the gibberellin-insensitive mutant (gai) of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **108**, 495-502.
- Xing, L., Li, J., Xu, Y., Xu, Z., Chong, K.**, 2009. Phosphorylation modification of wheat lectin VER2 is associated with vernalization-induced O-GlcNAc signaling and intracellular motility. *PLoS One* **4**, e4854.
- Yang, L.L., Haug, A.**, 1979. Purification and partial characterization of a procaryotic glycoprotein from the plasma membrane of *Thermoplasma acidophilum*. *Biochim. Biophys. Acta* **556**, 265-277.
- Yang, W.H., Kim, J.E., Nam, H.W., Ju, J.W., Kim, H.S., Kim, Y.S., Cho, J.W.**, 2006. Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 1074-1083.
- Zachara, N.E., Hart, G.W.**, 2004. O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. *Biochim. Biophys. Acta* **1673**, 13-28.
- Zayakina, O., Arkhipenko, M., Kozlovsky, S., Nikitin, N., Smirnov, A., Susi, P., Rodionova, N., Karpova, O., Atabekov, J.**, 2008. Mutagenic analysis of Potato Virus X movement protein (TGBp1) and the coat protein (CP): in vitro TGBp1-CP binding and viral RNA translation activation. *Mol. Plant Pathol.* **9**, 37-44.
- Zeidan, Q., Hart, G.W.**, 2010. The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. *J. Cell Sci.* **123**, 13-22.
- Zeidan, Q., Wang, Z., De Maio, A., Hart, G.W.**, 2010. O-GlcNAc cycling enzymes associate with the translational machinery and modify core ribosomal proteins. *Mol. Biol. Cell* **21**, 1922-1936.
- Zhang, F., Su, K., Yang, X., Bowe, D.B., Paterson, A.J., Kudlow, J.E.**, 2003. O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. *Cell* **115**, 715-725.
- Zhao, J., Liu, Q., Zhang, H., Jia, Q., Hong, Y., Liu, Y.**, 2013. The rubisco small subunit is involved in tobamovirus movement and Tm-2(2)-mediated extreme resistance. *Plant Physiol.* **161**, 374-383.
- Zwart, M.P., Daros, J.A., Elena, S.F.**, 2011. One is enough: in vivo effective population size is dose-dependent for a plant RNA virus. *PLoS Pathog.* **7**, e1002122.